



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular
Laboratório de Toxinologia

BEATRIZ ELENA SARMIENTO CERTUCHE

Caracterização dos principais mecanismos fisiopatológica envolvidos com a sintomatologia dos acidentes gerados pelo peixe *Pimelodus maculatus* (Siluriforme: Pimelodidae) e avaliação da atividade proteolítica do extrato aquoso do ferrão

Brasília, DF

2015

BEATRIZ ELENA SARMIENTO CERTUCHE

Caracterização dos principais mecanismos fisiopatológicos envolvidos com a sintomatologia dos acidentes gerados pelo peixe *Pimelodus maculatus* (Siluriforme: Pimelodidae) e avaliação da atividade proteolítica do extrato aquoso do ferrão

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

Orientadora: Dra. Elisabeth Ferroni Schwartz

Brasília, DF

2015

Dissertação de Mestrado

BEATRIZ ELENA SARMIENTO CERTUCHE

Título:

“Caracterização dos principais mecanismo fisiopatológicos envolvidos com a sintomatologia dos acidentes gerados pelo peixe *Pimelodus maculatus* (Siluriforme: Pimelodidae) e avaliação da atividade proteolítica do extrato aquoso do ferrão”

Comissão Examinadora:

Presidente da banca
Profa. Dra. Elisabeth Ferroni Schwartz
CFS-IB-UnB

Profa. Dra. Suely Gomes de Figueiredo Dias
Universidade Federal Espírito Santo, UFES - LQP
Membro titular

Profa. Dra. Fabiana Pirani Carneiro
Faculdade de Medicina- UnB
Membro titular

Dr. Leandro Ambrósio Campos
CFS-IB-UnB
Suplente

Brasília, 27 de fevereiro de 2015.

*Dedico este trabajo a mi familia por el
apoyo incondicional en cada una de mis
metas y sueños,*

Agradecimentos

Primeiramente a minha querida família, pelo amor, incentivo e suporte.

À Dra. Elisabeth Schwartz, pela orientação, sugestões e motivação. Muito obrigada pela oportunidade de me receber no seu laboratório e aprimorar a minha formação como Profissional.

À Doutoranda Martha Magalhães do Centro de Estudos e Pesquisas Biológicas (Cepb) da Pontífice Universidade Católica de Goiás (PUC-GO), por permitir o acesso ao laboratório, assessoria e sugestões nos experimentos para avaliar a atividade proteolítica do extrato aquoso.

Aos professores do laboratório de Toxinologia (LTx) da UnB. À Dra. Márcia Mortari pela assessoria e sugestões nos ensaios farmacológicos. Ao Dr. Carlos Schwartz pela assessoria nos registros do ensaio em coração de rã. Ao Dr. Osmino Pires Jr, pelas recomendações e ensinamentos. Ao Dr. Antonio Sebben, do laboratório de Anatomia comparativa de vertebrados (LACV) da UnB, pela ajuda e orientação no ensaio em coração de rã.

Aos colegas da disciplina “Farmacologia de princípios ativos de origem animal”: Solange Rego, Lilibete Pereira de Oliveira e Jacqueline Coimbra Gonçalves pela colaboração nos ensaios farmacológicos, análises de dados e redação do artigo. À Dra. Marisa Rangel pela orientação da disciplina e revisão do artigo. Ao Dr. Leandro Ambrósio Campos pela ajuda e sugestões nos ensaios realizados na disciplina. Ao Dr. Vidal Haddad Jr, pelas sugestões e correções do artigo.

Ao Washington Oliveira pela amizade e conversas, ao Adolfo Carlos pela amizade e assessorias técnicas na preparação dos reagentes.

À Solange Rego, Carol Barbosa, Thalita Soares, Lilibete Pereira, Fagner Neves e Andrea Carvalho pela amizade, motivação, sugestões e correções no português.

Ao Harry Morales, Claudia Arenas, Elena Triana, Diana Monsalve, Tatiana Ordoñez, Camilo Ferreira e Cesar Prias pelo carinho, apoio e companhia.

À CAPES, pela concessão da bolsa e pelo apoio recebido por meio do projeto aprovado pelo Edital Toxinologia. À Rede Pró-Centro-Oeste, com a qual esta pesquisa também está vinculada.

À Universidade de Brasília e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, pela oportunidade de desenvolvimento do projeto.

RESUMO

Os acidentes gerados pelos animais aquáticos, marinhos e fluviais, são muito comuns e a maioria deles ocorre de maneira ocasional gerando processos dolorosos como necroses, mutilações, perda de movimento e até morte. A sintomatologia dos acidentes gerados por peixes marinhos é amplamente conhecida; entretanto, ainda são poucos os estudos de caracterização dos acidentes provocados por peixes de água doce. A maioria dos acidentes envolvendo animais aquáticos no Brasil é causada por bagres marinhos e de água doce. *Pimelodus maculatus* é um peixe de água doce muito comum nas bacias brasileiras, responsável pela maioria dos acidentes, principalmente entre os pescadores. As características do veneno e seus mecanismos patológicos são pouco conhecidos. No presente estudo, foram caracterizados os principais efeitos (dor e edema) causados pelo extrato proteico do ferrão do peixe *P. maculatus*. Em termos de concentração de proteína, estima-se que o extrato proteico de um ferrão de *P. maculatus* contém aproximadamente 100 µg de proteína (equivalente a 62,5% do peso seco do extrato aquoso), provavelmente a quantidade de material proteico envolvido no envenenamento. O extrato proteico de um ferrão de *P. maculatus* gerou um acentuado efeito nociceptivo e edematogênico. O efeito inflamatório observado está relacionado a alterações na permeabilidade vascular e à expressão dos mediadores inflamatórios IL- 1β, IL- 6 e anti-inflamatório IL-10.

Além disso, o extrato proteico do ferrão do peixe *P. maculatus* induziu uma pequena diminuição na força de contração no coração *in situ* em rã na dose de 200 µg, e não provocou hemorragia ou alterações nos tempos de coagulação (tempo de protrombina e tromboplastina parcial ativada), mas induziu alterações significativas nos níveis de CK e CK-MB em camundongos. Foi observada ação proteolítica sobre caseína, elastina e colágeno, evidenciando a presença de proteases no veneno que favorecem sua difusão no tecido, que conseqüentemente favorece o envenenamento. Portanto, o presente estudo apresentou uma correlação entre os efeitos obtidos experimentalmente e os principais sintomas observados nos acidentes com o peixe *P. maculatus*, em decorrência só, da ação biológica do extrato proteico do ferrão.

Palavras chave: atividade cardiotoxica, atividade edematogênica, atividade inflamatória (Bagre, *Pimelodus maculatus*, peçonha)

ABSTRACT

Accidents generated by marine and freshwater animals are very common, and the most of them occur accidentally generating painful processes such as necrosis, mutilation, loss of movement and even death. The symptoms of accidents generated by marine fish are widely known; however, there are few studies to characterize accidents caused by freshwater fish. Most accidents involving aquatic animals in Brazil is caused by marine and freshwater catfish. *Pimelodus maculatus* is a very common freshwater fish in Brazilian basins, responsible for most accidents, mainly among fishermen. The characteristics of the venom and its pathological mechanisms are poorly understood. In this study, the mainly effects (pain and edema) generated by protein extract of thorn of *P. maculatus* fish. It is estimated that the protein extract of *P. maculatus* thorn contains about 100 µg of protein (equivalent to 62.5% of the dry weight of the aqueous extract), probably the amount of protein material involved in the envenomations. The protein extract of *P. maculatus* generated a strong nociceptive and edematogenic effect. The inflammatory effect is related to changes in vascular permeability and expression of inflammatory mediators IL-1 β , IL-6 and IL-10 anti-inflammatory.

Moreover, the protein extract of thorn of *P. maculatus* fish induced a slight decrease in the contraction force in *in situ* frog heart at dose of 200 µg, did not cause hemorrhage or alterations in clotting times (prothrombin time and activated partial thromboplastin time), but induced significant changes in the levels of CK and its isoenzyme CK-MB in mice. A proteolytic activity was observed for casein, elastin and collagen, indicating the presence of proteases in the venom favoring its diffusion in the tissue, which help the poisoning. Therefore, the present study present a correlation between the effects obtained experimentally and the main symptoms observed in accidents provoked by *P. maculatus*, as a result only of the biological action of the protein extract thorn

Keywords: cardiotoxic activity, edematogenic activity, inflammatory activity, (catfish, *Pimelodus maculatus*, venom)

Lista de Ilustrações

Figura 1. Ferrão peitoral de um bagre.....	2
Figura 2. Ferrão dorsal do bagre <i>Plotosus lineatus</i>	3
Figura 3. <i>Pimelodus maculatus</i>	5
Figura 4. Avaliação da atividade edematogênica em camundongos após das injeções suplantais do extrato aquoso do ferrão do peixe <i>P. maculatus</i>	27
Figura 5. Avaliação da atividade nociceptiva em camundongos após das injeções suplantais do extrato aquoso do ferrão do peixe <i>P. maculatus</i>	28
Figura 6. Alterações na permeabilidade vascular em ratos após das injeções intraperitoneais do extrato aquoso do ferrão do peixe <i>P. maculatus</i>	29
Figura 7. Dosagem da interleucina IL- 1 β	30
Figura 8. Dosagem da interleucina IL- 6.....	31
Figura 9. Dosagem da interleucina IL- 10.....	32
Figura 10. Avaliação das alterações eletrocardiográficas em coração <i>in situ</i> em rã	33
Figura 11. Dosagem de CK em soro de camundongos.....	34
Figura 12. Dosagem de CK-MB em soro de camundongos.....	35
Figura 13. Correlação da formação de edema e a expressão dos mediadores inflamatórios IL- 1 β , IL-6 e IL-10 na dose de 100 μ g do PME.....	43

Lista de Tabelas

Tabela 1. Valores da média \pm erro padrão da média de CK e de CK-MB dosados em soro de camundongos.....35

Tabela 2. Valores da média \pm Desvio padrão da média das atividades proteolíticas sob Caseína Elastina e Colágeno, após 2,4,6, e 8 horas de incubação com 100 μ g do Extrato aquoso do ferrão do peixe *Pimelodus maculatus* 36

Lista de abreviaturas e Siglas

Abs	Absorbância
ACh	Acetilcolina
AE	Atividade elétrica
APA	Alto paraná
ATO	Araguaia-Tocantins
BAP	Alto Paraguai
CK	Creatina Quinase
CK –MB	Isoenzima de Creatina Quinase
DA	Dopamina
Hz	Hertz
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IL-1	Interleucina 1
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
IL-1 β	Interleucina 1 beta
mV	Milivolt

NA	Noradrenalina
PME	Extrato aquoso do ferrão do peixe <i>P. maculatus</i>
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
TNF-α	Fator de necrose tumoral
TP	Protrombina
Trp	Triptofano
TTPa	Tromboplastina parcial ativada
V	Volt

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. PEIXES PEÇONHENTOS.....	1
1.2. SISTEMA INOCULADOR DA PEÇONHA DE PEIXES.....	2
1.3. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS PEÇONHAS DE PEIXES	3
1.4. ESPÉCIE DE ESTUDO <i>Pimelodus maculatus</i>	4
1.5. ACIDENTES E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DO ENVENENAMENTO	5
1.6. ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DA PEÇONHA DOS PEIXES.....	8
1.6.1. Atividade inflamatória e nociceptiva	9
1.6.2. Atividade cardiovascular.....	12
1.7. ATIVIDADES PROTEOLÍTICAS DA PEÇONHA DE PEIXES	13
2. RELEVÂNCIA CIENTÍFICA	15
3. OBJETIVOS	17
3.1. OBJETIVO GERAL.....	17
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1. COLETA DOS PEIXES	18
4.2. EXTRAÇÃO DA PEÇONHA.....	18
4.3. DOSAGEM DE PROTEÍNAS	18
4.4. ANIMAIS.....	18
4.5. ENSAIOS IN VIVO	19
4.5.1. Atividade edematogênica	19
4.5.2. Atividade nociceptiva.....	19
4.5.3. Atividade hemorrágica.....	20
4.5.4. Determinação do tempo de protrombina (TP) e de tromboplastina parcial ativado (TTPa).....	20
4.5.4.1. Determinação do tempo de protrombina (TP).....	21
4.5.4.2. Determinação do tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPa)	21
4.5.5. Avaliação das alterações da permeabilidade vascular	21

4.5.6. Dosagem das citocinasl.....	22
4.5.7. Avaliação das alterações eletrocardiográficas em coração in situ em rã	22
4.5.8. Coletas de sangue e dosagens séricas de Creatina Quinase (CK) e de sua isoenzima (CK -MB)	23
4.6. ATIVIDADES PROTEOLÍTICAS.....	24.
4.6.1. Atividade gelatinolítica em gel de SDS-PAGE	24
4.6.2. Atividade Caseinolítica	24
4.6.3. Atividade Colagenasica	25
4.6.4. Atividade Elastastica	25
5. RESULTADOS.....	26
5.1. EXTRATO PROTEÍCO DA PEÇONHA.....	26
5.2. ENSAIO EDEMATOGÊNICO	26
5.3. ENSAIO NOCICEPTIVO	27
5.4. ATIVIDADE HEMORRÁGICA E TEMPOS DE COAGULAÇÃO	28
5.5. ALTERAÇÕES NA PERMEABILIDADE VASCULAR	28
5.6. DOSAGEM DAS CITOCINAS	29
5.6.1. Dosagem interleucina IL- 1 B	29
5.6.2. Dosagem interleucina IL- 6	30
5.6.3. Dosagem interleucina IL- 10	31
5.7. AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES ELETROCARDIOGRÁFICAS EM CORAÇÃO <i>IN SITU</i> EM RÃ.....	32
5.8. ALTERAÇÕES NOS NÍVEIS DE DOSAGENS SÉRICAS DE CREATINA QUINASE (CK) E DE SUA ISOENZIMA (CK-MB)	34
5.9. ATIVIDADE GELATINOLÍTICA EM GEL SDS-PAGE, CASEINOLÍTICA, COLAGENASICA E ELASTASICA	36
6. DISCUSSÃO	38
7. CONCLUSÕES	48
8. PERSPECTIVA.....	49
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

10. ANEXO: DECLARAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO ANIMAL
(CEUA).....60

1. INTRODUÇÃO

1.1. PEIXES PEÇONHENTOS

Os peixes constituem quase 50% dos vertebrados sobre a Terra, classificados em Chondrichthyes e Osteichthyes, sendo os peixes ósseos agrupados em 445 famílias e 50 ordens que contêm cerca de 32.900 espécies de peixes (Froeser e Pauly, 2012). Dentro das 3.740 espécies que se sugerem ser peçonhentas (Smith e Wheeler, 2006), 600 espécies são peixes marinhos (arraias, peixe-escorpião, peixe-zebra, peixe-pedra, peixe-sapo etc.) e alguns peixes de água doce como os bagres (Smith e Wheeler, 2006).

Quanto à sua toxicidade, os peixes podem ser agrupados em peixes venenosos ou peçonhentos. Os primeiros obtêm sua toxicidade incorporando toxinas de plantas, algas ou outros organismos por meio da alimentação ou possuem vias metabólicas para produção dos seus venenos. Como exemplos podemos citar o baiacu papagaio (*Colomesus psittacus*), o peixe mero (*Epinephelus marginatus*) e barracuda (*Sphyraena barracuda*) (Grund, 2009).

Peixes peçonhentos são aqueles que apresentam glândulas ou tecidos especializados para a produção e secreção de substâncias tóxicas, além de um sistema especial para a inoculação destas (Russell, 1996). Como exemplo, podemos citar os peixes Niquim (*Thalassophryne nattereri*), peixe-pedra (*Synanceia trachynis*) e peixe-escorpião (*Scorpaena plumieri*).

Dentre os peixes marinhos considerados mais perigosos estão aqueles pertencentes à família Scorpaenidae, incluindo os gêneros *Pterois*, *Synanceia* e *Scorpaena* (Russell, 1996; Smith e Wheeler, 2006). Dentre os peixes de água doce causadores de acidentes, aqueles que pertencem à família dos bagres (Ariidae) são os mais comuns no Brasil (Haddad Jr, 2003). Todos utilizam sua peçonha para autodefesa e proteção (Gwee *et al.*, 1994), e nos envenenamentos geram uma sintomatologia clínica caracterizada pela presença de efeitos locais que incluem dor, edema, eritema e, em alguns casos, necrose (Haddad Jr, 2000). Entretanto, as manifestações sistêmicas como as desordens cardiorrespiratórias também podem ser observadas, principalmente, nos acidentes envolvendo peixes da família Scorpaenidae (Figueiredo *et al.*, 2009).

1.2. SISTEMA INOCULADOR DA PEÇONHA DE PEIXES

O aparelho inoculador da peçonha dos peixes peçonhentos consiste em uma estrutura básica chamada espinho: uma estrutura óssea coberta por um tecido tegumentar que contém as células secretoras do veneno. Uma vez que o espinho perfura o tecido da vítima em um acidente, o tecido tegumentar é lesionado e a peçonha é liberada no interior da ferida. O sistema de inoculação da peçonha responde a uma ação mecânica completamente involuntária ao invés de uma expulsão controlada e dosificada da peçonha (Maretec, 1998).

O espinho pode se localizar nas nadadeiras dorsais, peitorais, operculares, pélvicas e anais, dependendo da espécie (Williamson, 1995), exceto no peixe *yellow tail fang blennie* (*Meiacanthus nigrolineatus*) que possui um dente venenoso. Espinhos venenosos podem ser observados em peixes ósseos e cartilagosos, como as arraias. Algumas espécies apresentam espinhos mais desenvolvidos que outras, como por exemplo, o peixe *Synanceia* spp, cujo espinho contém glândulas e condutos especializados para o transporte da peçonha. Em outras espécies, o aparelho venenoso é menos desenvolvido e só tem um espinho associado a células secretoras da peçonha (Church e Hodgson, 2002). Além disso, espécies de peixes também têm a capacidade de secretar substâncias produzidas e armazenadas na própria pele, as chamadas crinotoxinas, que podem entrar em contato com a ferida no envenenamento (Thulesius *et al.*, 1983).

O aparato de peçonha dos bagres e mandis é constituído por ferrões ósseos localizados nas nadadeiras dorsal e peitoral. Esses ferrões são ligeiramente arqueados e afilados nas porções anterior e posterior apresentam uma margem retrosserrilhada (Figuras 1, 2) (Wright, 2009).



Figura 1. Ferrão peitoral de um bagre. S= espinho peitoral, ps = margem serrilhada posterior, gt = tecido glandular (Wright, 2009).

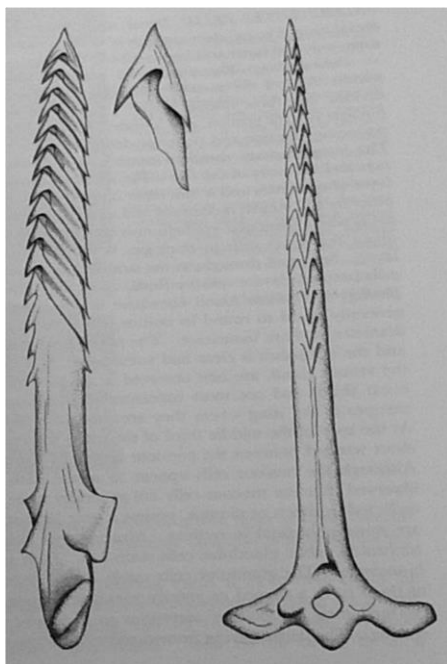


Figura 2. Ferrão dorsal do bagre *Plotosus lineatus* (Huang et al., 2013).

O ferrão é envolvido por uma fina camada de pele, chamada bainha tegumentar. Macroscopicamente não há evidência de glândula de peçonha, porém é possível identificar por microscopia que, no terço médio do ferrão, a pele divide-se em três áreas distintas: uma bainha tegumentar, uma porção intermediária óssea e um canal central. A bainha tegumentar constitui-se de uma camada espessa de epiderme e uma fina camada de derme. As células glandulares que compreendem as células responsáveis pela produção da peçonha estão entre as camadas da epiderme e derme, e concentradas nas margens antero e póstero-lateral do ferrão (Halstead, 1971).

1.3. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS PEÇONHAS DE PEIXES

A maior dificuldade na realização de pesquisas com peçonhas de peixes é a dificuldade da captura dos espécimes e extração da peçonha (Khoo, 2002), principalmente devido à sua possível natureza lábil (Schaeffer *et al.*, 1971; Carrijo *et al.*, 2005). A grande maioria das toxinas isoladas de peixes são proteínas termolábeis de alta massa molecular, entre 10 e 800 kDa (Figueiredo *et al.*, 2009), o que também dificulta sua purificação e estudo (Garnier *et al.*, 1995; Church e Hodgson, 2002a).

As poucas toxinas que têm sido estudadas com sucesso, principalmente as isoladas das peçonhas dos peixes marinhos, possuem atividade letal devido à sua alta toxicidade, como exemplo as

toxinas das peçonhas dos peixes do gênero *Synanceia*, que são altamente tóxicas quando comparadas às toxinas das peçonhas dos peixes dos gêneros *Pterois* e *Scorpaena* (Poh *et al.*, 1992). Dentre as espécies pertencentes à família Batrachoididae, o peixe-sapo (*Thalassophryne nattereri*) e o peixe-pipe (*Thalassophryne maculosa*) são as de maior importância toxicológica (Lopes-Ferreira *et al.*, 1998; Sosa-Rosales *et al.*, 2005).

Além dos compostos proteicos, sabe-se que as peçonhas contêm aminas biogênicas, noradrenalina (NA), dopamina (DA) e triptofano (Trp), conforme descrito nas peçonhas dos peixes do gênero *Synanceia* (Garnier *et al.*, 1995; Church e Hodgson, 2002a). Além disso, foram descritas serotonina na peçonha do peixe-soldado (*Gymnapistes marmoratus*) (Hopkins *et al.*, 1997) e altas concentrações de histamina e catecolaminas com atividade de colinesterase na peçonha do peixe-aranha (*Trachinus draco*) (Haavaldsen e Fonnunem, 1963).

A peçonha dos peixes-pedra (*Synanceia trachynis*, *S. horrida* e *S. verrucosa*) contém catecolaminas (Garnier *et al.*, 1996) e uma variabilidade de atividades enzimáticas (Khuo, 2002). Além disso, acredita-se que a peçonha dos peixes-pedra (*Synanceia trachynis*) (Church e Hodgson, 2002a) e o peixe-leão (*Pterois volitans*) possuem acetilcolinas ou colinomiméticos (Church e Hodgson, 2002b).

Grande parte dos trabalhos com caracterização de peçonhas de peixes é realizada com animais marinhos, e a geração de dados sobre envenenamentos por peixes de água doce apresenta pouca relevância epidemiológica (Haddad Jr, 2003); no qual a maioria dos acidentes com esses animais não são letais em comparação àqueles causados por animais marinhos. Ainda assim, os poucos estudos com peçonhas de peixes de água doce descrevem uma sintomatologia muito parecida à gerada por animais marinhos, portanto, é possível que essas peçonhas apresentem alguns compostos similares (Meier e White, 1995; Nonato *et al.*, 1996; Haddad Jr, 2000) e dessa forma, estudos com a peçonha de peixes dulcícolas podem revelar uma ampla fonte de novas toxinas ou compostos importantes para entender melhor seus efeitos no envenenamento.

1.4. ESPÉCIE DE ESTUDO *Pimelodus maculatus*

A espécie *Pimelodus maculatus* (Lacepède, 1803) (Figura 3) pertence à classe Actinopterygii, da ordem Siluriforme, família Pimelodidae, e, como outros bagres, caracteriza-se morfológicamente por apresentar ferrões cobertos por um muco tóxico nas nadadeiras peitorais e dorsais (Cemig e Cetec, 2000; Wright, 2009). Conhecido popularmente como mandi-amarelo (Haddad Jr *et al.*, 2012), *P. maculatus* pode alcançar de 40 a 50 cm de tamanho e um peso corporal de 1,5 a 2 kg (Ihering e Wright, 1935).

Essa espécie está presente na região neotropical com uma ampla distribuição nas bacias dos rios sul-americanos (Fowler, 1951), e habita no fundo dos rios com uma dieta variada constituída de larvas de insetos, algas, moluscos, peixes e fragmentos de vegetais (Bennemann *et al.*, 2000). Ele é responsável por cerca de 80% dos acidentes em pescadores profissionais e população ribeirinha, no qual a maioria das lesões (90%) ocorrem nas mãos das vítimas que manipulam o animal de forma errônea, sofrendo uma dor intensa, instantânea e latejante, com presença de edema e eritema no local da ferida persistindo por cerca de seis a oito horas, e subsequente inflamação e infecção (Haddad Jr e Lastória, 2005).

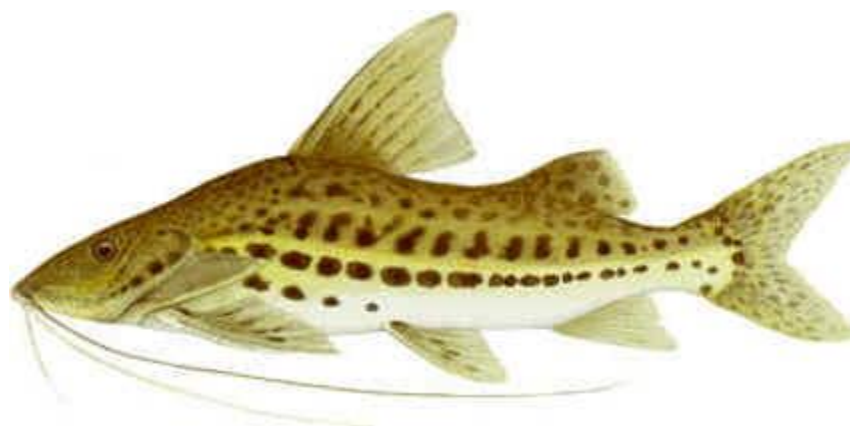


Figura 3. *Pimelodus maculatus* (Ilustração: Álvaro Nunes)

Até a data, estudos realizados com o peixe *P. maculatus* têm avaliado, principalmente, os aspectos ecológicos e reprodutivos da espécie presente nos estados de Goiás, Minas Gerais e na cidade de Rio de Janeiro (Albuquerque *et al.*, 2008; Arantes *et al.*, 2013 ; Sabinson *et al.*, 2014) e a caracterização genética da espécie no Uruguai (Ribolli *et al.*, 2012).

1.5. ACIDENTES E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DO ENVENENAMENTO

Os acidentes gerados pelos animais aquáticos, marinhos e fluviais são muito comuns, e a maioria deles ocorre de maneira ocasional gerando processos dolorosos como necroses, mutilações, perda de movimento e até mortalidade (Haddad Jr, 2004), sendo a sintomatologia dos acidentes gerados por peixes marinhos, amplamente conhecida. Por exemplo, o peixe-escorpião (*Scorpaena plumieri*), cujo veneno contém proteínas citotóxicas e neurotóxicas, gera como sintomatologia clínica vômitos, estresse respiratório, taquicardia e uma intensa dor; e o peixe-pedra (*Synanceja verrucosa*), cujo envenenamento caracteriza-se por gerar abscessos cutâneos, necroses, dor,

edema pulmonar entre outros (Kizer *et al.*, 1985; Haddad Jr, 2003). Entretanto, ainda são poucos os estudos de caracterização dos acidentes causados por peixes de água doce.

No Brasil, os principais peixes causadores de acidentes em humanos são as raias marinhas (*Dasyatis guttata*, *D. americana*, *Gymnra micrura*), raias fluviais (*Potamotrygon falkneri*, *P. motoro*), os bagres (*Bagre bagre*, *B. marinus*), mandis (*Genidens genidens*, *Pimelodella brasiliensis*, *Pimelodus maculatus*), peixe–escorpião (*Scorpaena brasiliensis* e *S. plumeri*), e niquim ou peixe–sapo (*Thalassophryne nattereri*, *T. amazônica*) (Haddad Jr, 2003; Facó *et al.*, 2005; Haddad Jr e Martins, 2006; Haddad Jr *et al.*, 2013).

Os acidentes causados pela família dos bagres (Ariidae) são os mais comuns no Brasil (Haddad Jr, 2003), dentre os quais 25% são causados por animais marinhos (Meier e White, 1995; Nonato *et al.*, 1996; Haddad Jr, 2000). Esta família é composta por 153 espécies, distribuídas em 20 gêneros, sendo que os mais importantes no Atlântico Sul são *Arius*, *Cathorops*, *Hexanemichthyes*, *Bagre* e *Genidens*, sendo esses gêneros relacionados com os acidentes no Brasil (Nelson, 2006).

De um total de 200 acidentes registrados em rios e lagos no Brasil, 40% são causados por bagres e mandis, 5% por arraias e o restante por peixes traumatizantes como piranhas e traíras (Haddad Jr, 2000). Os bagres dulcícolas, que são os maiores responsáveis pelos acidentes, especialmente os pertencentes à família Pimelodidae (mandijubas e mandis) (Haddad Jr, 2003), geram uma sintomatologia clínica muito parecida às registradas para os bagres marinhos (Meier e White, 1995; Nonato *et al.*, 1996; Haddad Jr, 2000). Essa família compreende os peixes de água doce neotropicais, com 29 gêneros descritos abrigando 94 espécies (Ferraris Jr, 2007), sendo o gênero *Pimelodus* (figura 3), o mais diversificado com 29 espécies descritas (Ribeiro *et al.*, 2008). Outros peixes como os pintados, jaús e armaus apresentam ferrão, porém ainda não se tem registro de que apresentem substâncias tóxicas (Haddad Jr, 2003).

Bagres e mandis são os principais causadores de acidentes com peixes no Brasil, sendo que 70% dos acidentes com animais aquáticos notificados estão relacionados com os bagres marinhos, e, em água doce, este índice pode chegar a 90% dos acidentes notificados (Garrone *et al.*, 2005; Haddad Jr e Martins, 2006). As principais espécies envolvidas são o pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*), mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*) e mandi-chorão (*Pimelodella* spp) (Haddad Jr, 2003; Haddad Jr e Lastória, 2005; Lopes-Ferreira *et al.*, 2014).

Em regiões continentais brasileiras, os peixes possuem grande importância na pesca de subsistência realizada pelos ribeirinhos além da pesca esportiva que tem grande relevância em algumas regiões (Silva *et al.*, 2010), como por exemplo, nas bacias do Alto Paraguai – BAP, Araguaia-Tocantins – ATO e Alto Paraná – APA, principalmente nos municípios da região pantaneira. Nesse último, a pesca é a segunda atividade de sustento econômico (Resende, 1988;

Sabino e Prado, 2006). Adicionalmente, na região do Pantanal e Mato Grosso do Sul, a pesca esportiva, profissional e comercial é de alta importância econômica (Amâncio, 2008).

Diversas espécies venenosas são encontradas frequentemente nas redes de pescadores e alguns animais são descartados em águas rasas ou na areia, o que leva ao aumento do risco dos acidentes (Haddad Jr, 2003). A manipulação errônea de animais ou itens de decoração de aquários também leva ao aumento desse número. Infelizmente, as informações dos mecanismos de trauma do envenenamento são escassas ou simplesmente não estão disponíveis (Haddad Jr *et al.*, 2012). Podem ser citados como exemplo, os mandis e bagres, tanto os de hábitos marinhos quanto os encontrados em áreas fluviais (Haddad Jr, 2004).

A maioria das espécies pertencentes à ordem Siluriforme apresenta ferrões ósseos nas nadadeiras dorsais e peitorais, responsáveis por lesões em pescadores. Quando o ferrão penetra no tecido da vítima, o rompimento do tecido glandular libera toxinas capazes de causar como sintomatologia clínica uma intensa dor, que também pode ocorrer devido à presença de resquícios do ferrão que permanece no local da lesão (Haddad Jr, 2000; Haddad Jr, 2003).

Esses resquícios podem ser indicados pela presença de fenômenos inflamatórios locais. Outras características dos acidentes são o edema e eritema que perduram de 6 a 8 horas (Haddad Jr e Lastória, 2005), e subsequente presença de infecção secundária principalmente por estafilococcus, estreptococos e bactérias como *Vibrio vulnificus* e *Aeromonas hydrophila*, responsáveis pelas infecções mais graves (Haddad Jr, 2000; Cardoso *et al.*, 2004).

Outro mecanismo de envenenamento apresentado pelos bagres ocorre por meio das chamadas crinotoxinas, as quais estão relacionadas no muco da pele dos peixes, e não estão associadas a nenhum tipo de inoculação. Acredita-se que estas toxinas são os precursores evolucionários daquelas presentes nos ferrões dos siluriformes (Shepherd *et al.*, 1994; Church e Hodgson, 2002). Estudos recentes demonstraram que muco e ferrão possuem componentes diferentes capazes de desencadear reações inflamatórias em animais de laboratório; porém, o papel das crinotoxinas no envenenamento ainda não está totalmente esclarecido (Junqueira *et al.*, 2007; Ramos *et al.*, 2012).

No Brasil, há uma relação inversa entre a frequência e a gravidade dos acidentes causados por bagres, arraias e peixes-escorpião, sendo os acidentes com bagres e arraias mais comuns e de gravidade média. Os acidentes com peixes-escorpião são mais raros, porém, muito graves (Haddad Jr, 2003), sendo a maioria das vítimas, pescadores que requerem longos períodos de cuidado.

A maioria dos pescadores não são contribuintes de um sistema de saúde, o que restringe seu acesso a um tratamento oportuno e adequado à doença; e portanto, podem permanecer ausentes

por vários dias do local de trabalho, gerando dificuldades econômicas intrafamiliares (Garrone Neto *et al.*, 2005).

A presença de animais venenosos é desproporcional ao tamanho da rede fluvial brasileira, que é considerada a maior do mundo (Haddad Jr, 2003). Os estudos sobre acidentes ocasionados por animais aquáticos possuem resultados dispersos e pouco elucidados em termos epidemiológicos, sintomáticos e terapêuticos, onde a maioria disponível tem como foco o estudo da peçonha de peixes continentais, incluindo as arraias (Charvet-Almeida *et al.*, 2002; Carvalho, 2003; Haddad Jr, 2004; Garrone Neto e Haddad Jr, 2009). Não existe até o momento nenhum trabalho de caracterização farmacológica com *P. maculatus*, considerada a responsável pela maioria dos acidentes com peixes do Brasil.

1.6. ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DA PEÇONHA DOS PEIXES

A produção de toxinas pelos animais aquáticos se estabelece como uma estratégia importante que assegura a sobrevivência dos mesmos num ecossistema diverso e altamente competitivo. Esses animais produzem um grande número de metabólitos, cujas combinações têm como resultado uma ampla variedade de moléculas complexas, como peptídeos e proteínas cujas propriedades químicas e farmacológicas são diferentes daquelas apresentadas pelo veneno dos animais terrestres (Russell, 1971).

Essas espécies podem produzir um envenenamento severo associado a uma dor intensa, alterações cardiovasculares, alterações neuromusculares, atividades citolíticas e hemolítica, cujos compostos são farmacologicamente ativos e podem servir como novas ferramentas para investigação (Church e Hodgson, 2002).

O extrato proteico dos ferrões de bagres caracteriza-se por apresentar compostos hemolíticos, necróticos, edematogênicos e vasoespásticos, os quais podem ser lábeis ao calor, pH e liofilização (Venkaiah e Lakshmiathi, 2000). As crinotoxinas, outra fonte de toxinas presentes na epiderme do peixe, podem revestir o ferrão e ser introduzido na ferida (Shiomi *et al.*, 1988). Tanto as crinotoxinas como o veneno podem induzir uma reação inflamatória local, eritema, dor, hemorragia e edema (Junqueira *et al.*, 2007). As manifestações sistêmicas não são uma sintomatologia comum nos acidentes (Blomkalns e Otten, 1999), no entanto, sequelas incapacitantes, incluindo a amputação da parte do corpo afetada devido a uma grave necrose no tecido, e morte têm sido relatadas (Baack *et al.*, 1991).

1.6.1. Atividade inflamatória e nociceptiva

A função fisiológica da dor é alertar o cérebro sobre alterações na homeostase fornecendo informação sobre o estímulo causador do dano tecidual, tendo origem nas fibras nervosas sensoriais periféricas através da ativação de nociceptores, que transmitem a informação do sistema nervoso periférico (SNP) para o sistema nervoso central (SNC). A nocicepção processa o estímulo nocivo no sistema nervoso e ativa os neurônios nociceptivos primários, por meio de terminações nervosas livres no sistema nervoso periférico, respondendo a estímulos mecânicos, térmicos e químicos. Esses estímulos ativam as vias periféricas da dor, além de vários mediadores inflamatórios que estão envolvidos na severidade, manutenção e gênese da sintomatologia (Cummins e Rush, 2007).

O reconhecimento inicial da ferida leva à produção e liberação de mediadores como histamina, serotonina, citocinas e outras substâncias que podem atuar nas fibras sensoriais, induzindo a dor pela ação direta em receptores pró-nociceptivos e/ou canais iônicos (Woolf, 2004; Giordano, 2005), ou atuando na sensibilização inicial das fibras aferentes primárias que reduz seus limiares para uma resposta a um estímulo de menor intensidade, fenômeno conhecido como hiperalgesia (Brown e Passmore, 2010).

Além desses mediadores, a liberação de catecolaminas por meio do sistema simpático leva a uma inflamação neurogênica (Haddad JJ, 2007; Rittner *et al.*, 2008a). As citocinas, uma classe de mediadores da resposta inflamatória com grande importância, são produzidas praticamente por qualquer tipo de célula (Hopkins, 2003; Dinarello, 2000).

As citocinas são mediadores importantes no sistema imunológico humano e estão associadas ao desenvolvimento dos processos inflamatórios (Boutros *et al.*, 2008), que levam à defesa do organismo, por meio do envio de sinais químicos entre as células (Nemsek *et al.*, 2001). Trata-se de proteínas de baixa massa molecular, entre 8 e 40.000 Da, responsáveis por regular as respostas infecciosas, imunes, inflamatórias e traumáticas (Dinarello, 2000), que podem ser enquadradas em diversas categorias de acordo com suas funções: interferons (IFN), interleucinas (IL), fator estimulador de colônias (CSF), fator de necrose tumoral (TNF) e fator de transformação de crescimento (TGF), produzidas principalmente pelos monócitos, macrófagos e linfócitos (Nemzek *et al.*, 2001).

Algumas citocinas promovem a inflamação e são conhecidas como citocinas pro- inflamatórias (IL-1B; IL-6; TNF- α), enquanto outras suprimem a atividade das citocinas pro-inflamatórias, as chamadas citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-10, e IL-13) (Dinarello, 2000).

As citocinas pro-inflamatórias são produzidas principalmente pelos monócitos e macrófagos ativados durante as respostas imunes inatas. A citocina IL-1 β é produzida por monócitos e macrófagos, mas também pelas células dendríticas epiteliais e outros tipos celulares; é responsável por induzir a liberação de histamina dos mastócitos, gerando vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular no local da inflamação. IL-6 é produzida por monócitos, macrófagos, fibroblastos, células endoteliais, linfócitos T e células do estroma da medula óssea, gerando a diferenciação dos linfócitos B em células plasmáticas, e induzindo a produção das imunoglobulinas (Dinarello, 2000).

O fator de necrose tumoral (TNF) foi descrito inicialmente pela capacidade de causar necrose em alguns tumores. Têm-se descrito duas moléculas fortemente relacionadas (TNF- α e TNF- β). TNF- α é produzida fundamentalmente por monócitos e macrófagos, está envolvida nos processos inflamatórios em decorrência aos processos infecciosos, induz a expressão de moléculas de adesão e estimula a produção de IL-8 a partir de células do endotélio vascular, contribuindo ao extravasamento de linfócitos, neutrófilos e monócitos. Enquanto que TNF- β é produzido exclusivamente por linfócitos T ativados, que se ligam aos mesmos receptores do TNF- α , induzindo, portanto, funções semelhantes (Dinarello, 2000).

As citocinas com atividade anti-inflamatória e imunossupressora inibem o crescimento celular ou suprimem a secreção das citocinas. IL-4, IL-13 e IL-10 ativam as ações dos linfócitos B, os quais inibem as respostas inflamatórias, sendo a IL-10 a citocina anti-inflamatória ou imunossupressora por excelência, produzida por linfócitos do tipo Th2, monócitos, macrófagos, linfócitos B entre outros tipos celulares. Possui como ação imunossupressora a inibição da síntese de muitas outras citocinas, como por exemplo: IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-12, a expressão de MHC-II e moléculas de adesão nos monócitos (Dinarello, 2000).

Tanto as citocinas pró e anti-inflamatórias são produzidas no local da inflamação e existe uma correlação entre seus níveis e a severidade do processo inflamatório, desencadeando uma cascata de produtos de genes, geralmente não produzidos em indivíduos saudáveis (Dinarello, 2000).

A resposta inflamatória local é uma das mais comuns manifestações fisiopatológicas que os diversos envenenamentos por peixes peçonhentos geram (Sivan, 2009), caracterizada clinicamente por dor e edema. Estudos epidemiológicos e experimentais realizados com peixes relatam a dor e a formação de edema como as principais sintomatologias geradas pelo envenenamento. Em 45 casos de envenenamento humano pelo peixe *Pterois volitans*, a principal sintomatologia foi uma dor intensa no local da ferida, e 60% dos casos apresentaram edema local (Kizer *et al.*, 1985).

Aldred e colaboradores (Aldred *et al.*, 1996) analisaram 101 registros dos acidentes com essa espécie e encontraram que 95% foram classificados como muito graves, caracterizados por uma

intensa dor no local, edema e eritema, e 13% apresentaram manifestações sistêmicas. A peçonha do peixe-sapo (*Thalassophryne nattereri*) induz uma resposta inflamatória local aguda nas patas de camundongos, uma intensa resposta edematogênica dose-dependente e a liberação local de três citocinas, Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), Interleucina 1 beta (IL-1 β) e Interleucina 6 (IL-6) (Lima *et al.*, 2003) .

A peçonha do peixe argus-verde (*Scatophagus argus*) causou uma intensa dor em todas as doses avaliadas no ensaio além de uma resposta edematogênica local em camundongos, caracterizada pela persistência da sintomatologia mesmo após 24 horas da injeção da peçonha, sugerindo uma potencial capacidade de formação de edema das toxinas presentes (Sivan *et al.*, 2007). Dois casos de envenenamentos pelos bagres de água doce em aquários foram reportados no período de 2009 a 2011 no “*Center of Noor and Ali Asghar Hospital, Isfahan University of Medical Sciences*” na Índia. As vítimas apresentaram dor, laceração, hemorragia, edema e eritema na área da ferida (mão), mas não apresentaram alterações sistêmicas (Gholamali, 2012).

A sintomatologia comum a todas as espécies de peixes é a intensa dor desproporcional ao tamanho da lesão (Sutherland e Tibballs, 2001), sendo indicado como tratamento submergir a parte do corpo lesionada em água quente, um processo eficaz que diminui essa sintomatologia em quase todas as espécies de peixes peçonhentos (Kizer *et al.*, 1985; Kasdan *et al.*, 1987; Trestrail e Al-mahasneh, 1989; Chan *et al.*, 1996 ; Rifkin e Williamson, 1996; Russell, 1996; Fenner, 2000; Sutherland e Tibballs, 2001; Haddad Jr *et al.*, 2004).

A temperatura é uma boa opção de emergência no envenenamento, mas representa um dilema para os pesquisadores, já que a peçonha apresenta certa labilidade ao calor, pH, liofilização, armazenamento e a ciclos de congelamento e descongelamento (Schaeffer *et al.*, 1971), sendo um obstáculo para o desenvolvimento da maioria das pesquisas e um debate em relação ao efeito do calor sobre a peçonha; sendo causado ou não pelo efeito vasoconstritor do veneno ou por outros mecanismos (Fenner, 2000); ou se esse efeito corresponde ao efeito vasoconstritor do veneno (Haddad Jr, 2000; Haddad Jr, 2003; Haddad Jr e Lastória, 2005; Haddad Jr, 2008).

No Brasil, estudos realizados em seis municípios de Mato Grosso do Sul e de Goiás indicam altos índices de acidentes causados por peixes, particularmente por aquelas espécies dotadas de ferrão, como os mandis *Pimelodus*, *Pimelodella* e *Rhamdia*; surubins como *Pseudoplatystoma corruscans* e *Pseudoplatystoma fasciatum* e a arraia *Potamotrygon* spp. As manifestações clínicas observadas foram feridas nas mãos e pés, acompanhadas de uma dor intensa, necroses e nos casos mais graves mutilações ou perda de movimento na extremidade afetada (Haddad Jr, 2004; Garrone Neto e Haddad Jr, 2009).

1.6.2. Atividade cardiovascular

As desordens cardiovasculares são uma das características mais relevantes no envenenamento por peixes peçonhentos em humanos; portanto, os estudos das alterações neste sistema têm sido o principal objetivo. Uma intensa atividade cardiovascular tem sido observada nos animais experimentais injetados com peçonha de peixes venenosos, sendo esta atividade um efeito dominante na maioria dos estudos (Sivan, 2009).

As respostas cardiovasculares induzidas por peixes peçonhentos são variáveis, mas comumente provocam contração do músculo liso e vasodilatação. Nas preparações cardíacas, os efeitos inotrópicos negativos envolvem a atividade de receptores muscarínicos e às vezes, são decorrentes da presença de colinomiméticos contidos na peçonha enquanto os efeitos positivos parecem ter relação com a atividade dos adrenoreceptores (Church e Hodgson, 2002).

Os efeitos da peçonha dos peixes sobre o coração são variáveis; por exemplo, o extrato proteico bruto do bagre *Heteropneustes fossilis* produz um incremento inotrópico em corações de sapos e de cobaias (Datta *et al.*, 1982). A fração letal do veneno nomeada “PC” isolada da peçonha do peixe *Plotosus caninus* causa uma parada temporária nas batidas do coração das cobaias, uma ação que não é afetada por qualquer bloqueio dos receptores adrenérgicos ou muscarínicos (Auddy e Gomes, 1996), caracterizando - se o efeito cardiovascular gerado pelo peixe.

A fração nomeada “TLY” isolada da peçonha do peixe-pedra (*Synanceia trachynis*) interage com os receptores muscarínicos produzindo um efeito inotrópico negativo, hiperpolarizando as membranas celulares das fibras do coração da rã, gerando como resposta fisiológica uma diminuição na força de contração (Sauviat *et al.*, 2000). A peçonha do peixe-escorpião (*Scorpaena guttata*) gera uma resposta bifásica em corações isolados de ratos, uma diminuição inicial na força e velocidade, seguida de um incremento sustentado na força de contração, determinando-se que a peçonha atua sobre os receptores muscarínicos e adrenoreceptores (Carlson *et al.*, 1971).

A peçonha do bagre do Golfo Pérsico *Arius thalassinus* produz respostas contráteis nas preparações musculares devido à atividade nos receptores muscarínicos (Thulesius *et al.*, 1983). O mesmo ocorre com a peçonha do peixe *Gymnapistes marmoratus* (Hopkins e Hodgson, 1998), peixe-pedra (*Synanceia trachynis*) (Church e Hodgson, 2002b) e o peixe-leão (*Pterois volitans*), onde a fase negativa é atribuída à atividade dos receptores muscarínicos, e a fase positiva à atividade adrenoreceptora (Hopkins e Hodgson, 1998).

A resposta contrátil induzida pelas peçonhas dos bagres *Heteropneustes fossilis* e *Plotosus caninus* em diferentes tipos de musculaturas lisas parece envolver prostaglandinas (Auddy *et al.*, 1994). Um efeito hipotensivo foi descrito para as peçonhas do peixe-pedra (*Synanceia horrida*) e o

peixe-leão (*Pterois volitans*) em coelhos anestesiados, efeito atribuído em parte à vasodilatação periférica, uma vez que a frequência cardíaca não foi alterada (Saunders *et al.*, 1962).

As variabilidades das respostas cardiovasculares geradas pelas peçonhas dos peixes, além de existirem devido às diferenças das espécies, também se referem aos modelos experimentais utilizados; por exemplo, estudos com coelho apresentaram só uma fase de alteração cardiovascular, enquanto que em estudos com outros animais as respostas foram bifásicas. Este efeito também pode ocorrer pelas diferenças nas concentrações testadas; por exemplo, a peçonha do peixe-pedra (*Synanceia trachynis*) pode mudar de um efeito vasodilatador para um vasoconstritor dependendo da concentração avaliada (Church e Hodgson, 2002).

É importante ressaltar que os poucos estudos se referem à caracterização farmacológica da peçonha de peixes de água doce e, até o momento, nenhuma pesquisa foi realizada com a espécie *Pimelodus maculatus*, considerada a responsável pelos maiores acidentes com peixes do Brasil. Para esta espécie tem-se descrito apenas a sintomatologia clínica gerada pelo acidente.

1.7. ATIVIDADES PROTEOLÍTICAS DA PEÇONHA DE PEIXES

As enzimas são componentes importantes e muito comuns nas peçonhas dos animais peçonhentos (aranhas, escorpiões, serpentes, abelhas, etc.) provavelmente envolvidas na ação tóxica de suas peçonhas e em outras funções (Nget-Hong e Ponnudurai, 1992).

A atividade proteolítica tem sido amplamente estudada nas peçonhas de serpentes, especialmente as da família Crotalidae, descobrindo-se o importante papel das proteases nas atividades patológicas geradas pelo veneno. Esse fenômeno não é diferente para os venenos dos animais aquáticos. Atividade proteolítica foi demonstrada para as peçonhas de *Potamotrygon cf. scobina* e *Potamotrygon* gr. *orbigny* (Magalhães *et al.*, 2006)

Os poucos venenos dos peixes que têm sido estudados possuem variedade de atividades enzimáticas, como por exemplo, o veneno do peixe-pedra (*Synanceia horrida*) que contém muitas propriedades enzimáticas incluindo hialuronidase, aminopeptidase, fosfodiesterase, entre outras (Khoo *et al.*, 1992; Garnier *et al.*, 1995). Uma hialuronidase foi identificada na caracterização da peçonha do peixe *S. verrucosa* (Garnier *et al.*, 1995). A peçonha do peixe *S. trachynis* possui pronunciada atividade de hialuronidase quando comparada à quantidade da enzima presente na peçonha do peixe *S. horrida* (Hopkins e Hodgson, 1998).

Enzimas presentes na peçonha do peixe-escorpião (*Scorpaena plumieri*) causaram hidrólise da caseína e gelatina (Carrijo *et al.*, 2005). A peçonha do peixe-escorpião da água doce (*Notesthes*

robusta) não tem ação de fosfolipase A₂ nem hialuronidase, mas tem uma pequena atividade proteolítica e hemolítica (Hahn e O'connor, 2000). No entanto, a peçonha do peixe-leão (*Pterios volitans*) tem atividade proteolítica gerada por uma protease de 45 kDa (Balasubashini *et al.*, 2006), refletindo os efeitos variáveis que têm as peçonhas de peixes. Atividade proteolítica também tem sido reportada para as peçonhas dos peixes *Thalassophryne natteri* e *T. maculosa* (Lopes-Ferreira *et al.*, 1998; Sosa-Rosales *et al.*, 2005). Sivan e colaboradores (Sivan *et al.*, 2007) avaliaram a atividade proteolítica gerada pelo extrato proteico do peixe *Scatophagus argus* sob caseína e, Barbaro e colaboradores (Barbaro *et al.*, 2007) demonstraram que o extrato proteico da arraia *Potamotrygon falkneri* contém proteases com a capacidade de degradar a caseína, gelatina e o fibrinogênio.

Outros compostos foram identificados nas peçonhas de *Potamotrygon falkneri* e *Potamotrygon motoro*, como fosfolipases, fosfatases ácidas, hialuronidases, enzimas caseinolíticos, gelatinolíticos e elastinolíticos (Magalhães, 2001; Haddad Jr *et al.*, 2004; Magalhães *et al.*, 2008).

2. RELEVÂNCIA CIENTÍFICA

Estudos epidemiológicos em nível mundial relatam as altas incidências dos acidentes gerados pelo contato com peixes marinhos peçonhentos (Haddad Jr, 2003), portanto a maioria das pesquisas tem focado em explicar as sintomatologias envolvidas no envenenamento, e assim incrementar os dados epidemiológicos que são escassos e não muito bem elucidados para os acidentes gerados por peixes da água doce.

No Brasil, há uma relação inversa entre a frequência e a gravidade dos acidentes com peixes (bagres, arraias e peixes-escorpião) (Haddad Jr, 2003); sendo a maioria das vítimas, pescadores que requerem de longos períodos de cuidado, e na maioria não são contribuintes do sistema de saúde privado, restringindo seu acesso a os benefícios para o tratamento oportuno e adequado à doença (Garrone Neto *et al.*, 2005).

Os peixes possuem grande importância econômica e social no Brasil, sendo a pesca esportiva e principalmente a pesca de subsistência, muito comum especialmente em regiões ribeirinhas (Silva *et al.*, 2010). Uma grande variedade de espécies venenosas pode ser encontrada frequentemente nas redes de pescadores, o que aumenta consideravelmente o risco de acidentes porque muitos dos peixes são descartados em águas rasas, ou na areia da praia (Haddad Jr, 2003).

Os acidentes com animais aquáticos marinhos também podem ocorrer por meio da manipulação errônea dos animais ou itens de decoração de aquários, hábito que cresceu de forma exponencial sem as informações dos riscos associados aos mesmos. Podem ser citados como exemplo, os mandis e bagres, tanto os de hábitos marinhos quanto os encontrados em áreas fluviais (Haddad Jr, 2004). Nota-se um elevado índice de acidentes envolvendo o *Pimelodus maculatus*, conhecido popularmente como mandi-amarelo (Haddad Jr *et al.*, 2012).

Esta espécie está presente em áreas neotropicais e é responsável por cerca de 80% dos acidentes em pescadores profissionais e população ribeirinha, no qual as maiores lesões (90%) ocorrem nas mãos das vítimas que manipulam o animal de forma errônea (Haddad Jr e Lastória, 2005). Além disso, no Brasil, os estudos sobre acidentes ocasionados por animais aquáticos possuem resultados dispersos e pouco elucidados em termos epidemiológicos, sintomáticos e terapêuticos.

Por outro lado, a produção de toxinas provenientes de animais aquáticos estabelece-se como uma estratégia importante que assegura a sobrevivência dos mesmos num ecossistema diverso e altamente competitivo, para defender-se, defender seu território ou simplesmente como mecanismo de predação, em decorrência à alta toxicidade dos compostos ativos presentes nesses venenos.

Portanto, estes animais produzem um grande número de metabólitos, cujas combinações têm como resultado uma ampla variedade de moléculas complexas, como peptídeos e proteínas cujas

propriedades químicas e farmacológicas são diferentes daquelas apresentadas por pelo veneno dos animais terrestres (Russell, 1971). As pesquisas já realizadas com venenos de animais aquáticos demonstram que estas misturas complexas constituem uma ampla fonte de substâncias com diferentes atividades farmacológicas (Lopes - Ferreira *et al.*, 2004), indicando que a peçonha de peixes tem uma grande quantidade de moléculas bioativas que parecem ter um papel fundamental no envenenamento.

Além disso, saber que o Brasil tem uma ampla rede hidrográfica e um extenso litoral de incalculável biodiversidade desperta interesse na realização de estudos com toxinas provenientes de organismos presentes nestes ambientes. .A maioria das pesquisas que envolve a bioprospecção de novas peçonhas tem sido efetuada com organismos marinhos, e apenas uma pequena parcela envolve pesquisas com animais de água doce (Church e Hodgson, 2002). Não existe até o momento nenhum trabalho de caracterização farmacológica com *Pimelodus maculatus*, sendo este o primeiro estudo realizado.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Caracterização dos principais mecanismo fisiopatológicos envolvidos com a sintomatologia dos acidentes gerados pelo peixe *Pimelodus maculatus* (Siluriforme: Pimelodidae) e avaliação da atividade proteolítica do extrato aquoso do ferrão

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a possível atividade inflamatória local mediante as atividades edematogênica, nociceptiva e a expressão dos mediadores inflamatórios gerados pelo extrato proteico do ferrão do peixe *Pimelodus maculatus* em camundongos da linhagem Swiss (*Mus musculus*).
- Determinar as possíveis alterações na permeabilidade vascular geradas pelo extrato proteico do ferrão do peixe *Pimelodus maculatus* em ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) por meio do ensaio azul de Evans.
- Avaliar a possível atividade hemorrágica gerada pelo extrato proteico do ferrão do peixe *Pimelodus maculatus* em camundongos da linhagem Swiss (*Mus musculus*).
- Determinar as possíveis alterações nos tempos de protrombina (TP) e de tromboplastina parcial ativada (TTPa) no plasma sanguíneo de camundongos da linhagem Swiss (*Mus musculus*) gerada pelo extrato proteico do ferrão do peixe *Pimelodus maculatus*.
- Avaliar as possíveis alterações cardiovasculares geradas pelo extrato proteico do ferrão do peixe *Pimelodus maculatus* por meio do ensaio de coração *in situ* em rã (*Lithobates catesbeianus*).
- Determinar as possíveis alterações nos níveis das dosagens séricas de Creatina Quinase (CK) e de sua isoenzima (CK-MB) em sangue de camundongo da linhagem Swiss (*Mus musculus*) geradas pelo extrato proteico do ferrão do peixe *Pimelodus maculatus*.
- Avaliar o extrato proteico do ferrão do peixe *Pimelodus maculatus* quanto às atividades proteolíticas de atividade gelatinolítica em gel de SDS – PAGE, atividade caseinolítica, atividade elastásica e atividade colagenásica.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. COLETA DOS PEIXES

P. maculatus (Pimelodidae, Siluriformes) conhecido popularmente como mandi-amarelo (Haddad Jr *et al.*, 2012), está distribuído em todo o Brasil, sendo presente nos rios dos estados do Mato Grosso do Sul e Goiás (Brasil). Os espécimes usados neste trabalho foram coletados no alto curso do Rio Paraná, no município de Três Lagoas – Mato Grosso do Sul, sob licença do “Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade”–ICMBio n^o 34975-2.

4.2. EXTRAÇÃO DA PEÇONHA

Os ferrões foram extraídos manualmente a partir de animais capturados vivos para fins comerciais, após descarte dos pescadores. Os ferrões foram congelados, levados ao laboratório e, posteriormente descongelados e raspados, sendo que o material obtido foi macerado em nitrogênio líquido e ressuspenso em água ultrapura. Após esta etapa, o material raspado foi centrifugado a 14000 *g* por 15 min. O sobrenadante foi liofilizado e armazenado a -20 °C até o uso. O extrato proteico do ferrão de *P. maculatus* será designado pela sigla PME no decorrer do texto.

4.3. DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A determinação da concentração de proteínas totais do PME foi realizada baseada no método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951), utilizando-se albumina bovina como padrão (1 mg/mL). Uma amostra do PME (20 µL) foi misturada a 1,0 mL da solução “C”, reagente constituído de 98% de solução “B” (Carbonato de Sódio 0,188 M, Hidróxido de Sódio 1 M, diluídos em água destilada suficiente para 1 L) e 2% de solução “A” (Sulfato de Cobre Pentahidratado 0,2 M, Citrato de Sódio Dihidratado 0,3 M), diluído em água destilada suficiente para 100 mL. Após 10 minutos de incubação a temperatura ambiente, foi adicionado 100 µL da solução “D”, reagente constituído de Folin 1 N e água destilada. Os tubos foram incubados durante 30 min em temperatura ambiente. Decorrido este tempo, a absorbância foi medida em 750 nm.

4.4. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos e ratos heterogênicos da *linhagem* Swiss (*Mus musculus*) e Wistar (*Rattus norvegicus*), de ambos os sexos, pesando entre 25 e 32g e 250 e 300g, respectivamente, e uma rã (*Lithobates catesbeianus*). Os animais foram provenientes do Biotério da Universidade de Brasília e da empresa “**Rander**”; mantidos em condições de temperatura (23 – 25°C) e o ciclo claro/ escuro controlados, com livre acesso à ração e água. O número de animais usados foi o mínimo requerido para cada ensaio. Durante todas as fases dos experimentos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, e autorizado pelo Comitê de Ética em Uso Animal da Universidade de Brasília sob licença n^o (63468/2014).

4.5. ENSAIOS *IN VIVO*

4.5.1. Atividade edematogênica

A atividade edematogênica do PME foi avaliada de acordo com o método descrito por Mortari e colaboradores (Mortari *et al.*, 2012), com modificações. Os edemas formados na pata esquerda dos camundongos foram medidos com um pleitismógrafo (Hugo Basile 7140 plethysometer, Comerio, VA, Itália). As doses de 30, 70 e 100 µg do PME preparadas em 50 µL de NaCl (150 mM) foram injetadas subplantarmente na pata esquerda posterior dos camundongos, após anestesia dos animais com Tiopental Sódico (60 mg/kg) (5 animais/4 grupos). O edema foi determinado a cada 15 min durante a primeira hora e a cada 30 min na segunda hora. Como grupo controle, 50 µL de solução salina foram aplicados da mesma forma na pata direita posterior.

Os resultados foram calculados como a diferença entre os valores de percentagem de aumento do volume da pata, conforme a equação: $E = (V_f - V_i) \times 100$; onde, V_f = volume da pata após a injeção da peçonha em um determinado tempo; V_i = volume inicial da pata e E = aumento percentual do diâmetro da pata.

Os dados foram submetidos ao teste ANOVA de segunda via com pós-teste BONFERRONI ($p < 0.05$) e plotados em curvas tempo e efeito.

4.5.2. Atividade nociceptiva

O comportamento nociceptivo foi avaliado por meio da injeção subplantar em camundongos. O ensaio foi realizado de maneira similar ao ensaio de formalina (Hunskar e Hole, 1987) onde duas

fases foram observadas; fase I (0 – 10 min) referente ao efeito agudo, e a fase II (10 – 30 min) associada à liberação de mediadores endógenos envolvidos na resposta inflamatória (Le Bars *et al.*, 2001). Camundongos (n = 5 animais/4 grupos) foram usados. As doses de 10, 45 e 85 µg do PME dissolvidas em 50 µL de NaCl (150 mM) foram injetadas subplantarmente na pata esquerda posterior de camundongos. Como controle positivo foram injetados 50 µL de formalina (4%), e controle negativo 50 µL de NaCl (150 mM), por meio da mesma via de administração. Após injeção, cada animal foi levado a uma caixa de acrílico, onde os comportamentos característicos da dor como o ato de balançar e morder a pata injetada foram observados. O tempo que cada animal leva realizando esses comportamentos foi verificado entre 0 e 10 min (fase I) e, entre 10 e 30 min (fase II). Uma vez terminado o ensaio, os animais foram imediatamente eutanasiados com Tiopental Sódico (180 mg/kg).

Os dados foram plotados em um gráfico de barras, em função das médias e erros padrão, em decorrência das respostas aguda e inflamatória para cada um dos tratamentos. Os dados foram submetidos ao teste ANOVA de uma via seguido do teste T (Tuckey) ($p < 0.05$).

4.5.3. Atividade hemorrágica

A atividade hemorrágica do PME foi avaliada de acordo com o método descrito por Mortari e colaboradores (Mortari *et al.*, 2012) com modificações. A atividade hemorrágica foi avaliada pela presença de um halo hemorrágico na pele dos camundongos. Após anestesia dos animais com Tiopental Sódico (60 mg/kg) (5 animais), a dose de 100 µg do PME preparada em 50 µL de NaCl (150 mM) foi injetada por via intradérmica no dorso esquerdo dos camundongos. O dorso direito dos animais recebeu uma injeção de 50 µL de NaCl (150 mM), como controle negativo. Duas horas após injeção, os animais foram eutanasiados com Tiopental sódico (180 mg/kg) e a pele foi removida, evidenciando atividade pela presença de um halo hemorrágico de 10 mm de diâmetro (Nikai *et al.*, 1984).

4.5.4. Determinação do tempo de protrombina (TP) e de tromboplastina parcial ativado (TTPa)

As alterações no tempo de protrombina (TP) e de tromboplastina parcial ativado (TTPa) foram avaliadas utilizando os *kits* da WAMA diagnóstica conforme adaptação dos protocolos descrito a seguir:

4.5.4.1. Determinação do tempo de protrombina (TP)

Foram coletados por punção cardíaca 4 mL de sangue de camundongos dos animais usados como controle nos ensaios de nocicepção e o edema ($n = 5$ animais/2 grupos), e transferidos a um tubo contendo Citrato de Sódio (3,2%). Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 15 min a 3000 g, e 100 μ L do sobrenadante (plasma) foram transferidos a um tubo plástico e incubados a 37°C por 1 min. Simultaneamente, a dose de 100 μ g do PME foi dissolvida em 50 μ L de NaCl (150 mM) e incubada a 37°C por 1 min. Após esse tempo, o plasma foi transferido para os tubos com PME, onde foram adicionados 200 μ L do reagente TP pré-incubado 37°C por 10 min, disparando-se simultaneamente o cronômetro e, delicadamente por leve inversão, registrou-se o tempo de coagulação do plasma em segundos. NaCl (150 mM) (50 μ l) foi usado como controle.

4.5.4.2. Determinação do tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPa)

Foram coletados por punção cardíaca 4 mL de sangue dos camundongos usados como controle nos ensaios de nocicepção e o edema ($n = 5$ animais/2 grupos) e transferidos em tubo contendo Citrato de Sódio (3,2%). Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 15 min a 3000 g e 100 μ L de sobrenadante (plasma) foram transferidos a um tubo plástico e incubados a 37°C por 1 min. Simultaneamente, a dose de 100 μ g do PME foi preparada em 50 μ L de NaCl (150 mM) e incubada a 37°C por 1 min. Após esse tempo, o plasma foi transferido para os tubos com PME e adicionou-se 100 μ L do reagente TTP, homogeneizando a suspensão do reagente por inversão e incubando a 37°C por 3 min. Finalmente, foram adicionados 100 μ L de Cloreto de Cálcio (0,02M) pré-incubado (37°C por 10 min), disparando simultaneamente o cronômetro, e delicadamente por leve inversão, registrou-se o tempo de coagulação do plasma em segundos. NaCl (150 mM) (50 μ L) foi usado como controle.

4.5.5. Avaliação das alterações da permeabilidade vascular

Para a avaliação das alterações na permeabilidade vascular foi realizado o ensaio de Azul de Evans (Junqueira *et al.*, 2007), com modificações. Após anestesia com Tiopental Sódico (60 mg/kg) ($n = 5$ animais/3 grupos), os animais receberam injeções por meio da via intravenosa na veia caudal de 20 mg/kg do reagente Azul de Evans preparado em 200 μ L de NaCl (a 150 mM).

Após 20 min, as doses de 30 e 70 µg do PME preparadas em 200 µL de NaCl (150mM) foram injetadas por via intraperitoneal.

Após duas horas da injeção, os animais foram eutanasiados com Tiopental Sódico (180 mg/kg), e a cavidade peritoneal lavada com 2 mL de PBS frio (NaCl 137 mM, KCl 2,68 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,7 mM, pH 7,2). O lavado contendo as células foi centrifugado a 5000 g por 5 min, e o sobrenadante foi coletado para leitura de absorbância em 620 nm (UV Spectrophotometer Shimadzu, Kyoto, Japan) como indicador de Azul de Evans. Os dados foram expressos em µg de Azul de Evans/mL, estimados com curva de calibração padrão, e submetidos ao teste ANOVA de uma via seguido do teste T (Tuckey) (p<0.05).

4.5.6. Dosagem das citocinas

Camundongos (n = 5 animais/7 grupos) receberam injeções subplantares (50 µL) na pata esquerda contendo 100 µg do PME e 50 µL de NaCl foram injetados na pata direita como controle. Após 15 min, 1, 2, 6, 8, 14 e 24 horas do tratamento, os animais foram eutanasiados com Tiopental Sódico (180 mg/kg) e as patas foram amputadas. O tecido foi macerado com morteiro e homogeneizado em 200 µL de PBS frio (NaCl 137 mM, KCl 2,68 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,7 mM, pH 7,2), até obter 1,2 mL de suspensão celular. As amostras foram centrifugadas a 3000 g por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi separado e congelado a 80°C até o uso, conforme Lima e colaboradores (Lima *et al.*, 2003).

O sobrenadante foi utilizado para dosagens das citocinas IL-1β, IL-6, TNF-α e IL-10, de acordo com as instruções do *kit* ELISA Ready – SET-GO (affymatrix-eBioscience, San Diego, CA, EUA). As amostras foram quantificadas por comparação com curvas padrão de citocinas para camundongos. Os resultados foram expressos como a média aritmética e erro padrão. Os dados foram submetidos ao teste *t* de *student* para amostras independentes.

Os limites de detecção foram de 8 pg/mL para IL-1β, 4 pg/mL para IL-6, 8 pg/mL para TNF-α e 32 pg/mL para IL-10.

4.5.7. Avaliação das alterações eletrocardiográficas em coração *in situ* em rã

A rã (*Lithobates catesbeianus*) foi inicialmente anestesiada com cloreto de lidocaína 2% (1 mL) via *foramen magno* e, em seguida, espinhalada e descerebrada com auxílio de uma agulha. A cavidade peritoneal foi aberta, a veia cava posterior canulada com um tubo de polietileno contendo

solução Ringer ((em mM): 111 NaCl; 1,9 KCl; 1,1 CaCl₂; 2,4 NaHCO₃; 10 glicose, pH 7,2.) para anfíbios, e o ápice do ventrículo do coração foi conectado, por meio de uma pinça cardíaca para um transdutor mecânico-elétrico F60 (NarcoBio Systems, Austin, TX, EUA).

O nervo vago direito foi exposto ao nível da veia jugular e conectado a um par de eletrodos para estimulação a 6 V e 10 Hz com duração de 0,5 ms (S48 stimulator – Grass Instrument Division, Warwick, RI, EUA). Os registros elétricos foram obtidos por meio de um eletrodo de sucção posicionado na região mediana no ventrículo, sobre o epicárdio. Esse eletrodo consiste em um tubo de polietileno com um fio metálico de prata cloretada no seu interior na extremidade próxima ao coração, preenchido com solução Ringer e uma válvula com uma seringa na outra extremidade. O eletrodo foi conectado a um amplificador DC de alto ganho (NarcoBio Systems, Austin, TX, EUA). Um segundo eletrodo metálico de prata cloretada foi inserido dentro da câmara cardíaca da rã, servindo como conexão à “terra” (Mourão *et al.*, 2012).

As respostas mecânicas e elétricas do coração foram avaliadas de acordo com Schwartz e colaboradores (Schwartz *et al.*, 1999) e registradas em papel por meio de um polígrafo a uma velocidade de 2,5 mm/seg. As doses de 3,4 x 10⁻⁴ M (0,01 mg) de acetilcolina, 1,7 x 10⁻³ M de atropina (0,1 mg), 100 e 200 µg do PME foram testadas. Os compostos foram administrados na veia cava posterior, em um volume de 200 µL de solução Ringer.

4.5.8. Coletas de sangue e dosagens séricas de Creatina Quinase (CK) e de sua isoenzima (CK - MB)

Camundongos anestesiados com Tiopental Sódico (60 mg/kg) (n = 5 animais/4 grupos), receberam injeções subplantares contendo 30, 70 e 100 µg do PME. Duas horas após o tratamento, o sangue foi coletado por punção cardíaca, armazenado em tubos sem anticoagulantes e imediatamente centrifugado a 20.000 g por 20 min a 10°C. O sobrenadante foi separado e congelado a - 20°C até o uso, conforme (Oliveira *et al.*, 2013), com modificações.

O sobrenadante foi utilizado para dosagens séricas de CK de acordo com as instruções do *kit* CK–NAK Liquiform Ref. 117 (Labtest ®) e CK–MB de acordo com as instruções do *kit* CK–MB Liquiform Ref. 118 (Labtest ®) onde ambos foram utilizados para a determinação quantitativa da atividade de CK e CK–MB em modo cinético em soro de camundongos.

As diferenças observadas nas dosagens séricas de CK e CK–MB de camundongos que receberam as injeções do PME com os que receberam as injeções de NaCl, foram assumidas como alterações nos níveis séricos dessas enzimas. Os dados foram submetidos ao teste ANOVA de uma via seguido do teste T (Tuckey) (p<0.05).

4.6. ATIVIDADES PROTEOLÍTICAS

4.6.1. Atividade gelatinolítica em gel de SDS-PAGE

A zimografia da peçonha foi avaliada de acordo com os ensaios de atividade gelatinolítica em gel de SDS-PAGE, baseado no método de Plater e colaboradores (Plater *et al.*, 1995) onde as zonas de atividade proteolítica foram identificadas por áreas claras da gelatina digerida.

Um gel de poliacrilamida 15% contendo gelatina 0,1% (Sigma G6144) incorporada à matriz foi utilizado para detectar a atividade proteolítica. 100 µg do PME foram preparados em 20 µL de tampão de amostra (tris-base 1M, pH 6,8, SDS 10%, glicerol 50%, azul de bromo fenol 1%). A eletroforese foi realizada utilizando-se tampão Tris-glicina (Tris-base 25 mM, glicina 2,6 M, SDS 1%, pH 8,4) em voltagem constante de 125 V e corrente de 30 mA, durante 90 min, a 4°C.

Foram utilizados marcadores moleculares como padrões de massa molecular. Ao final da corrida o *slot* contendo os marcadores moleculares foi removido, fixado e corado com Coomassie Blue R-250 0,1% diluído em solução contendo metanol 50% e ácido acético glacial 12% durante 30 min. A descoloração foi realizada em solução contendo a mesma proporção dos reagentes, exceto o corante. O restante do gel foi lavado em solução renaturante (Triton X-100 0,25%), em temperatura ambiente, sob leve agitação, durante 30 min. Decorrido este tempo, o gel foi lavado duas vezes com tampão de reação (Tris-base 5 mM, NaCl 20 mM e CaCl₂ 0,5 mM, pH 7,0), sob leve agitação, durante 30 min cada lavagem.

Em seguida, o gel foi incubado durante 48 horas a 37°C, no mesmo tampão. Após o período de incubação, o gel foi corado com Coomassie Blue R-250 0,5% diluído em solução contendo metanol 50% e ácido acético glacial 12%, e descorado em solução contendo a mesma proporção dos reagentes, exceto o corante. As zonas de atividade proteolítica foram identificadas por áreas claras onde a gelatina foi digerida.

4.6.2. Atividade Caseinolítica

A atividade caseinolítica foi realizada de acordo com o proposto por Kunitz (Kunitz, 1947), modificado por Tan e Tan (Tan e Tan, 1988) onde a atividade específica é definida como a quantidade de enzima que produz um aumento de 0,001 unidade de absorvância por mg de proteína.

50 µL do PME (100 µg do PME) foram misturados a 500 µL de solução de caseína 1% (Sigma C-5890) em tampão fosfato (250 mM, pH 7,75). A reação foi incubada durante 2 horas a 37°C e, logo depois, interrompida com a adição de 500 µL de ácido tricloroacético 5%. Após centrifugação a 10.000 g durante 10 min, a absorbância foi medida a 280 nm e comparada com o branco

4.6.3. Atividade Colagenásica

A atividade colagenásica foi determinada de acordo ao método proposto por Chavira e colaboradores (Chavira *et al.*, 1984) usando o corante azocoll como substrato não cromogênico.

Cinco mg do Azocoll foram dissolvidos em 1 mL de tampão PBS (NaCl 137 mM,, KCl 2,68 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,7 mM, pH 7,2). 50 µL do PME (100 µg do PME) foram misturados ao reagente Azocoll, incubando-se por 2 horas a 37°C com agitação constante. Após incubação, a suspensão foi centrifugada a 5000 g por 5 min, e a absorbância da solução foi lida a 520 nm. A atividade específica foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a liberação do corante azocoll causando uma mudança de absorbância de 0,001 unidade de absorbância por mg de proteína.

4.6.4. Atividade Elastásica

A atividade proteolítica com Elastina-Congo-Red (Sigma E-0502) foi determinada de acordo ao método de Naughton e Sanger (Naughton e Sanger, 1961). 1 mg de Elastina-Congo-Red foi dissolvido em 1 mL de tampão PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,68 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,7 mM, pH 7,2). 50 µL do PME (100 µg do PME) foram misturados à suspensão de Elastina-Congo-Red, incubando-se por 2 horas a 37°C sob agitação constante. Após a incubação, a suspensão foi centrifugada a 5000 g por 5 min, e a absorbância da solução foi lida a 490 nm. A atividade específica foi definida como a quantidade de enzima que produz um aumento de 0,001 unidade de absorbância por mg de proteína.

5. RESULTADOS

5.1. EXTATO PROTEÍCO DA PEÇONHA

Para obtenção dos extratos, aproximadamente 900 ferrões foram totalmente removidos com auxílio de bisturi, macerados com nitrogênio líquido e quantificados pelo método de Lowry.

Cinco ferrões dorsais de características semelhantes do peixe *P. maculatus* foram raspadas, e o material obtido foi macerado com nitrogênio líquido e diluído em água ultrapura, obtendo-se 500 µg de proteína total. Sendo assim, foi possível estimar que cada ferrão contém em torno de 100 µg do PME.

5.2. ENSAIO EDEMATOGÊNICO

A dose de 100 µg do PME induziu edema estatisticamente significante, durante todo o tempo do experimento (Figura 4). Em relação ao tempo, podemos observar que os grupos que receberam as doses de 30 µg e 70 µg comportaram-se de maneira diferenciada nos primeiros 30 min. A dose de 30 µg induziu edema em 30 min, se manteve sem variação com 45 min e apresentou uma diminuição aos 60 min. A dose de 70 µg manteve o edema sem variação até 30 min e também apresentou uma redução aos 60 min.

A dose de 100 µg induziu edema aos 15 min e pequena diminuição até os 60 min, mostrando que todas as doses utilizadas apontaram um comportamento diferenciado até os 45 min, uma diminuição aos 60 min e depois não houve variação nas mesmas até os 120 min, último tempo de leitura do teste, sugerindo que o edema tende a diminuir no transcorrer do acidente.

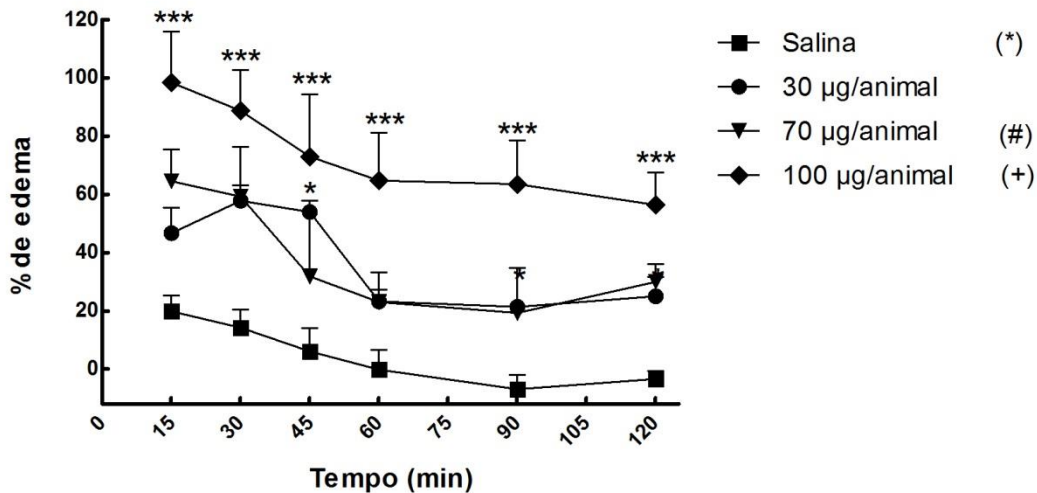


Figura 4. Avaliação da atividade edematogênica em camundongos após das injeções suplantais do extrato aquoso do ferrão do peixe *P. maculatus*. Grupo controle negativo ■ (50 µL de solução salina). Grupos teste: ● 30 µg do PME dissolvidos em 50 µL de solução salina, ▲ 70 µg do PME dissolvidos em 50 µL de solução salina, ◆ 100 µg PME dissolvidos em 50 µL de solução salina. Os resultados são expressos em porcentagem de aumento do volume de pata em relação aos dados iniciais obtidos antes da injeção. Os pontos representam a média ± SEM (n = 5/grupo). Os dados foram submetidos ao teste ANOVA de segunda via com post teste BONFERRONI. * Diferenças significativas em relação à salina: *p < 0.05; ***p < 0.001; # Diferenças significativas em relação à dose 70 µg #p < 0,05 e + Diferenças significativas em relação à dose 100 µg +p < 0,05.

5.3. ENSAIO NOCICEPTIVO

Na fase aguda (fase I), não há diferença significativa entre as doses de 10 µg e 45 µg de PME e o controle negativo (NaCl 150 mM). Porém, esses resultados são estatisticamente diferentes do controle positivo (formalina 4%) (Figura 5). Na dose de 85 µg, podemos observar uma diferença significativa entre os controles negativo e positivo e a dose de 10 µg, porém, não existe diferença entre esta dose e a de 45 µg. Na fase inflamatória (fase II), as doses de 10 e 45 µg são estatisticamente diferentes apenas do controle positivo (formalina 4%) e não entre si, somente a dose de 85 µg apresentou diferença significativa entre o controle negativo (NaCl 150 mM) e as outras duas doses testadas (10 e 45 µg), não havendo diferença com a formalina. Assim, o PME, na dose de 85 µg, foi capaz de induzir dor equivalente à administração de formalina 4% durante a fase inflamatória do ensaio.

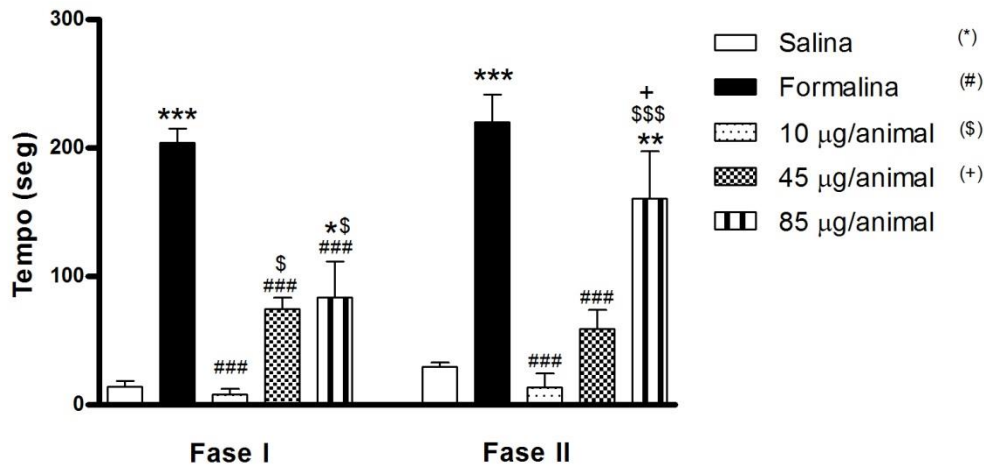


Figura 5. Avaliação da atividade nociceptiva em camundongos após das injeções suplantais do extrato aquoso do ferrão do peixe *P. maculatus*. Grupo controle negativo □ 50 µL de solução salina. Grupo controle positivo ■ 50 µL formalina 4% em solução salina. Grupos teste: ▨ 10 µg PME dissolvidos em 50 µL de solução salina, ▩ 45 µg do PME dissolvidos em 50 µL de solução salina, ▪ 85 µg do PME dissolvidos em 50 µL de solução salina. Os pontos representam a média ± SEM (n = 5/grupo). O comportamento nociceptivo na primeira fase (0-10 minutos após a injeção) e a segunda fase (10-30 min após a injeção) foi marcado como a quantidade de tempo que o animal lambeu ou mexeu a pata traseira injetada. Os dados foram submetidos ao teste ANOVA de uma via seguido do teste T (Tuckey). * Diferenças significativas em relação à salina: *p < 0,05; ***p < 0,001; # Diferenças significativas em relação à formalina ###p < 0,001 e \$ Diferenças significativas em relação à dose 10 µg \$p < 0,05; \$\$\$p < 0,001. + Diferenças significativas em relação à dose 45 µg +p < 0,05.

5.4. ATIVIDADE HEMORRÁGICA E TEMPOS DE COAGULAÇÃO

A dose estimada de um ferrão (100 µg do PME) foi avaliada quanto à atividade hemorrágica. Após duas horas de observação, não se verificou a presença de halo hemorrágico na pele do dorso dos animais. A mesma dose não provocou alterações nos tempos de protrombina e de tromboplastina parcial ativado (dados não mostrados).

5.5. ALTERAÇÕES NA PERMEABILIDADE VASCULAR

Alterações na permeabilidade vascular foram avaliadas por meio da quantidade de Azul de Evans (injetado na veia caudal) na lavagem peritoneal após injeção intraperitoneal do extrato aquoso do ferrão. O corante azul de Evans liga-se às proteínas séricas podendo ser usado para quantificar as alterações na permeabilidade vascular. Os resultados sugerem que o PME induz aumento da permeabilidade vascular e esta é dose dependente (Figura 6).

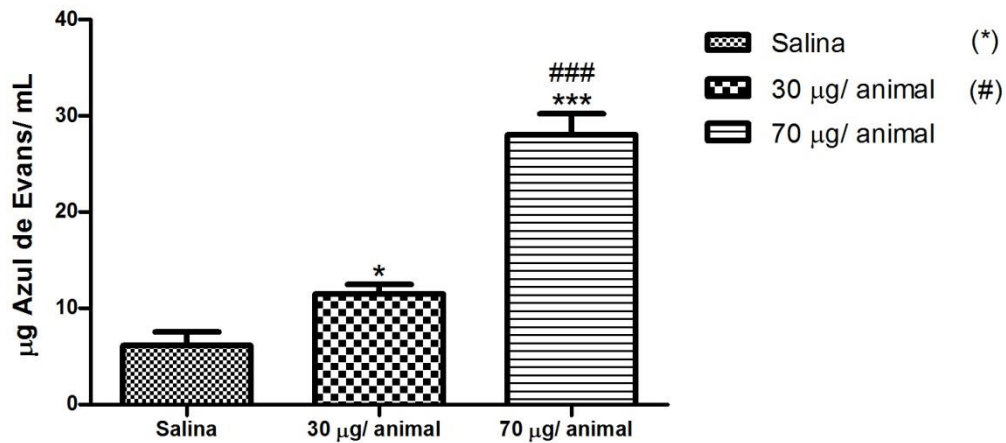


Figura 6. Alterações na permeabilidade vascular em ratos após das injeções intraperitoneais do extrato aquoso do ferrão do peixe *P. maculatus*. Grupo controle negativo 200 µL de solução salina. Grupos teste: 30 µg do PME dissolvidos em 200 µL de solução salina, 70 µg do PME dissolvidos em 200 µL de solução salina. Os pontos representam a média ± SEM (n = 5/grupo). Os dados foram expressos em µg de Azul de Evans/mL e submetidos ao teste ANOVA de uma via seguido do teste T (Tuckey). * Diferenças significativas em relação à salina. *** = p<0.001; * = p<0.05. # Diferenças significativas em relação à dose 30 µg.

5.6. DOSAGEM DAS CITOCINAS

Os mediadores inflamatórios IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-10 foram avaliados nos homogeneizados do tecido da pata de camundongos após a injeção do PME. A resposta inflamatória local gerada por 100 µg do PME caracterizou-se pela expressão dos mediadores pró-inflamatórios IL-1 β , IL-6 e o mediador anti-inflamatório IL-10 (Figuras 7, 8 e 9). O PME não promoveu a expressão do mediador inflamatório TNF- α em tempo algum (dados não apresentados).

5.6.1. Dosagem interleucina IL-1 β

A expressão da interleucina IL-1 β se apresentou desde os primeiros 15 minutos e foi aumentando ao longo do tempo diferenciando-se estatisticamente do grupo controle até a 6^a hora, onde o PME gerou a máxima expressão de IL-1 β (160,84 pg/mL). Estima-se que os níveis de IL-1 β retornaram aos níveis normais após 24 horas, devido a que nesse último tempo de avaliação ainda havia presença da interleucina (Figura 7).

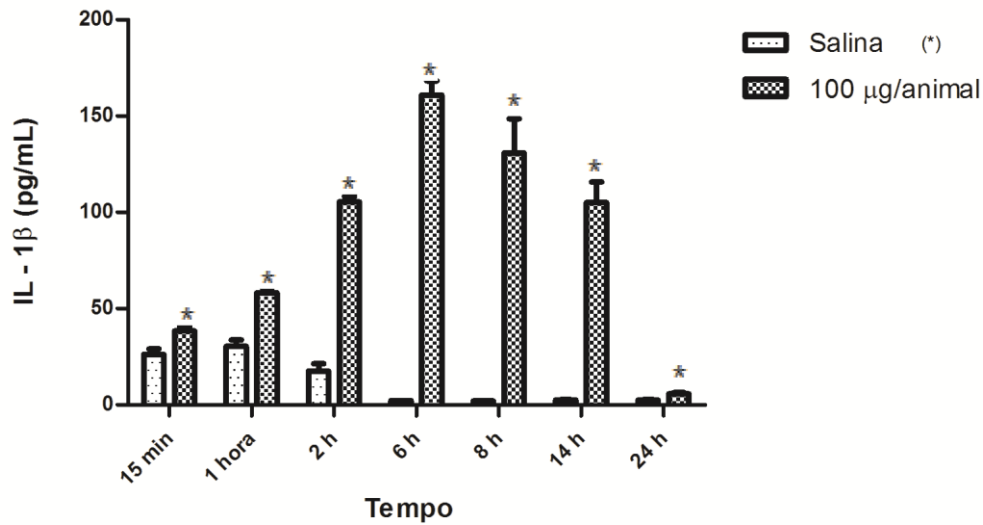


Figura 7. Dosagem da interleucina IL- 1 β . Os níveis da interleucina IL-1 β foi medida no macerado das patas do tecido de camundongos após 15 min, 1, 2, 6, 8, 14 e 24 horas da injeção com 100 μ g do PME dissolvido em 50 μ L de solução salina. Os pontos representam a média \pm SEM (n = 5/grupo). Os dados foram expressos em pg/mL da citocina e submetidos ao teste t *student* para amostras independentes.* Diferenças significativas em relação à salina.* = $p < 0.05$.

5.6.2. Dosagem interleucina IL- 6

A expressão da interleucina IL-6 se apresentou desde os primeiros 15 minutos e foi aumentando ao longo do tempo diferenciando-se estatisticamente do grupo controle até a 8^a hora, onde o PME gerou a máxima expressão de IL-6 (410,07 pg/mL). Estima-se que os níveis de IL-6 retornaram aos níveis normais após 24 horas, devido a que nesse último tempo de avaliação ainda havia presença da interleucina (Figura 8).

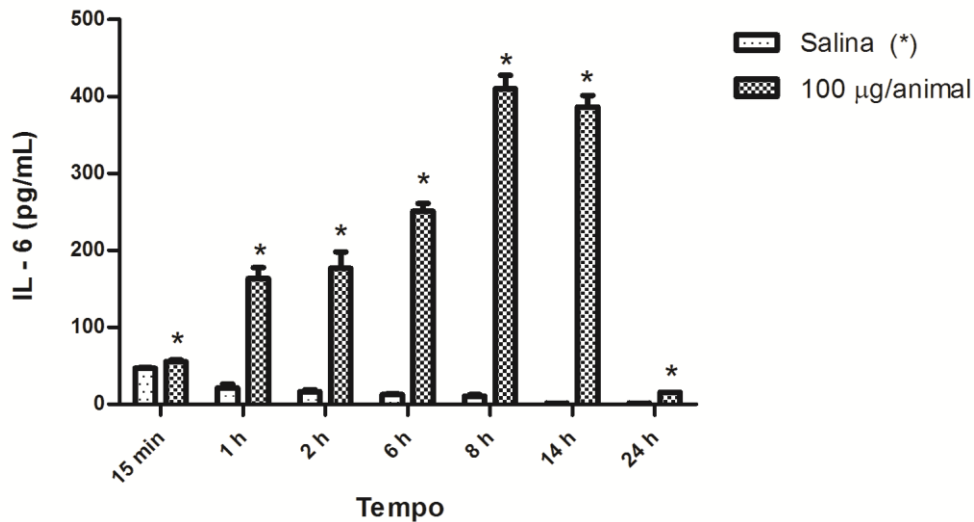


Figura 8. Dosagem da interleucina IL- 6. Os níveis da interleucina IL-6 foi medida no macerado das patas do tecido de camundongos após 15 min, 1, 2, 6, 8, 14 e 24 horas da injeção com 100 µg do PME dissolvido em 50 µL de solução salina. Os pontos representam a média ± SEM (n = 5/grupo). Os dados foram expressos em pg/mL da citocina e submetidos ao teste t *student* para amostras independentes. * Diferenças significativas em relação à salina.* = p<0.05.

5.6.3. Dosagem interleucina IL-10

A expressão da interleucina IL-10 se apresentou após a 1^a hora da injeção do PME e foi aumentando ao longo do tempo diferenciando-se estatisticamente do grupo controle até 6^a hora, com uma máxima expressão nesse tempo (189,08 pg/mL). Estima-se que os níveis de IL-10 retornaram aos níveis normais após 24 horas, devido a que nesse último tempo de avaliação ainda havia presença da interleucina (Figura 9).

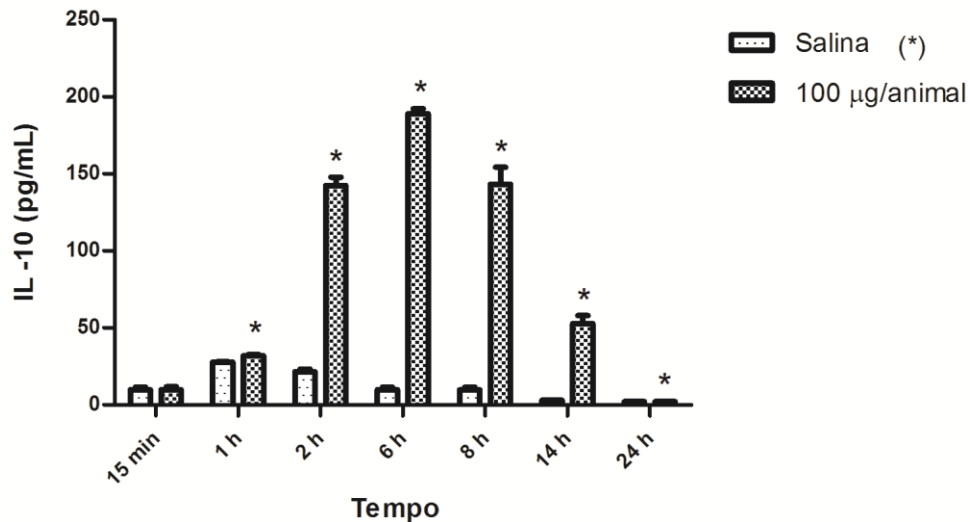


Figura 9. Dosagem da interleucina IL- 10. Os níveis da interleucina IL-10 foi medida no macerado das patas do tecido de camundongos após 15 min, 1, 2, 6, 8, 14 e 24 horas da injeção com 100 µg do PME dissolvido em 50 µL de solução salina. Os pontos representam a média ± SEM (n = 5/grupo). Os dados foram expressos em pg/mL da citocina e submetidos ao teste *t student* para amostras independentes. * Diferenças significativas em relação à salina.* = p<0.05.

5.7. AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES ELETROCARDIOGRÁFICAS EM CORAÇÃO *IN SITU* DE RÃ

As alterações eletrocardiográficas em coração *in situ* de rã foram avaliadas quanto às mudanças na frequência cardíaca (registro elétrico) e na força de contração (registro mecânico do ventrículo). Acetilcolina e atropina nas concentrações de $3,4 \times 10^{-4}$ M (0,01 mg) e $1,7 \times 10^{-3}$ M (0,1 mg), respectivamente, foram testadas como controles para conferir o bom funcionamento do coração. As doses de 100 e 200 µg do PME diluídas em 200 µL de solução Ringer foram avaliadas.

Apenas a dose de 200 µg do PME ocasionou uma leve diminuição na força de contração, um efeito inotrópico negativo, possivelmente via liberação e/ou modulação da atividade da acetilcolina (ACh) das terminações nervosas do sistema parassimpático autônomo. O efeito inotrópico negativo gerado pelo PME foi reversível após 40 s, sendo equivalente a aproximadamente metade da resposta induzida pela acetilcolina na concentração de $3,4 \times 10^{-4}$ M.

O PME (200 µg) diminuiu a força de contração em 44,62% em comparação à acetilcolina que diminuiu em 96,92%, para o mesmo tempo de recuperação da atividade normal do coração (40 s) e, atropina na concentração de $1,7 \times 10^{-3}$ M aumentou em média a frequência cardíaca de 36 batimentos por minuto (bpm) para 42 bpm.

O extrato não provocou alterações na frequência cardíaca e, portanto, pode-se concluir que a alteração cardiovascular induzida pelo extrato é discreta (Figura 10).

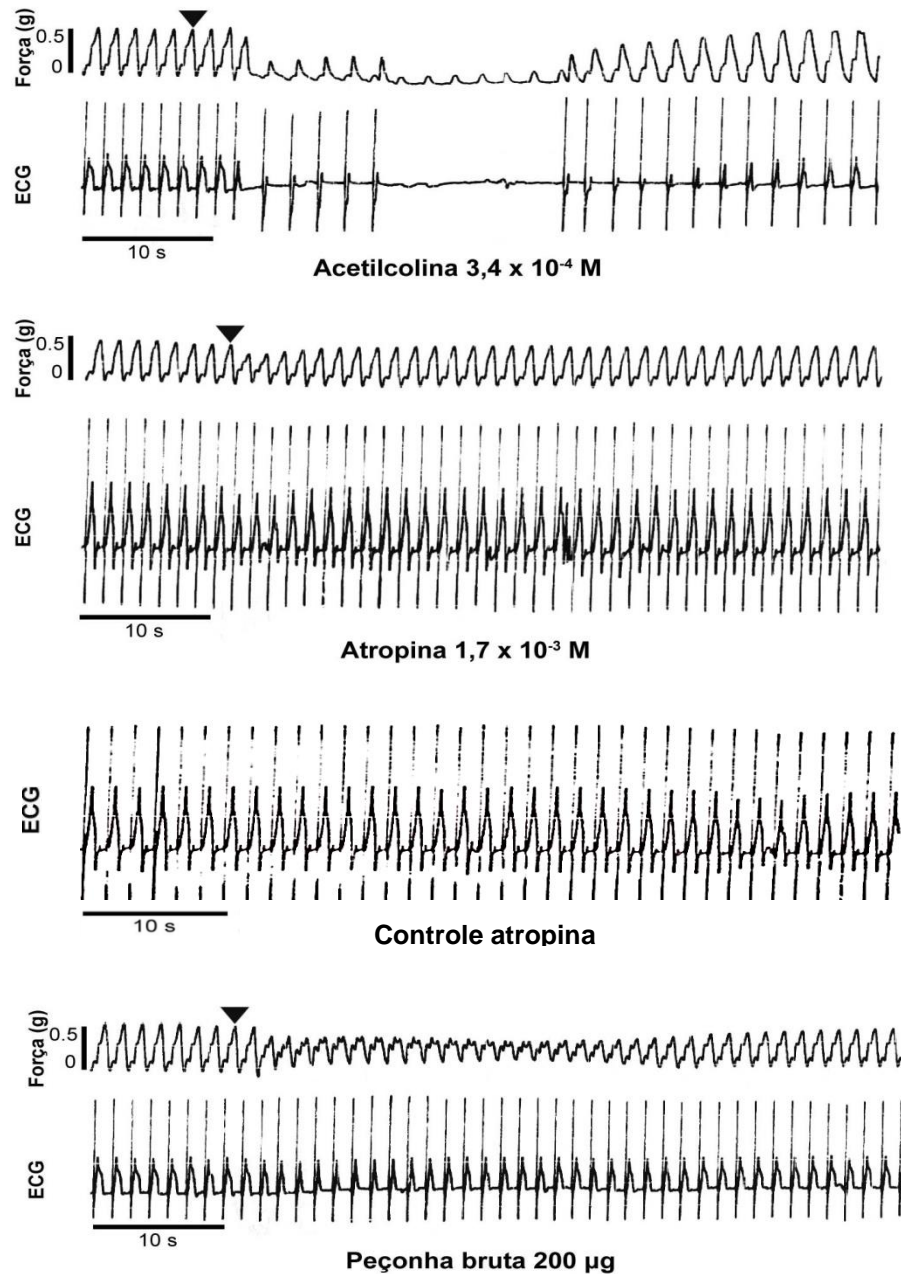


Figura 10. Avaliação das alterações eletrocardiográficas em coração in situ em rã. 200 μ g do PME; $3,4 \times 10^{-4}$ M de acetilcolina e $1,7 \times 10^{-3}$ M de atropina foram testados. Os eventos da força de contração e o eletrocardiograma (ECG) foram registrados em papel por meio de um polígrafo a uma velocidade de 2,5 mm/seg, depois da estimulação vagal (6V, 10 Hz, 0,5 ms) no equipamento S48 stimulator –Grass Instrument Division, Warwick, RI, EUA e um transdutor mecânico–elétrico F –60 (NarcoBio Systems).

5.8 . ALTERAÇÕES NOS NÍVEIS DE DOSAGENS SÉRICAS DE CREATINA QUINASE (CK) E DE SUA ISOENZIMA (CK-MB)

Os resultados das dosagens de Creatina Quinase (CK) e de sua isoenzima (CK-MB), duas horas após a administração via subplantar do PME (30, 70 e 100 µg/animal) em camundongos, estão representados na tabela 1 e nas Figuras 11 e 12. Também foi realizado um grupo controle no qual foi injetado NaCl.

A injeção do PME via subplantar induziu um aumento na concentração sérica da enzima Creatina Quinase quando comparada à salina. Pode-se dizer também que esse aumento apresentou uma tendência a dose-dependência. O mesmo pode ser observado em relação à concentração de CK-MB, porém a dose de 30 µg não apresentou diferença significativa em relação à salina.

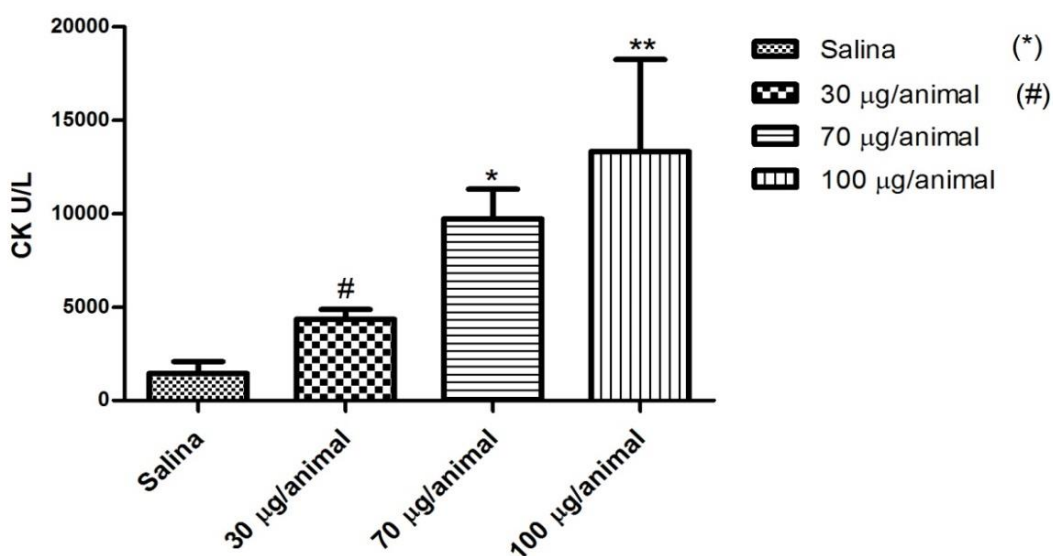


Figura 11. Dosagem de CK em soro de camundongos. Grupo controle negativo 50 µL de solução salina. Grupos teste: 30 µg do PME dissolvidos em 50 µL de solução salina, 70 µg do PME dissolvidos em 50 µL de solução salina, 100 µg do PME dissolvidos em 50 µL de solução salina. Os pontos representam a média ± SEM (n = 5/grupo). Os dados foram submetidos ao teste ANOVA de uma via seguido do teste T (Tuckey). * Diferenças significativas em relação à salina. * p<0.05 ; ** p<0.01. # Diferenças significativas em relação à dose 100 µg.

Tabela 1. Valores da média \pm erro padrão da média de CK e de CK-MB dosados em soro de camundongos.

Grupo	CK (U/L) (média, \pm E.P.M.)	CK-MB (U/L) (média, \pm E.P.M.)
Controle (n=5)	1451,79 \pm 643,22	273,87 \pm 54,03
100 μ g (n=5)	13331,09 \pm 4903,38	1303,56 \pm 69,76
70 μ g (n=4)	9718,82 \pm 1582,39	1020,86 \pm 155,76
30 μ g (n=5)	4351,17 \pm 522,07	464,59 \pm 43,48

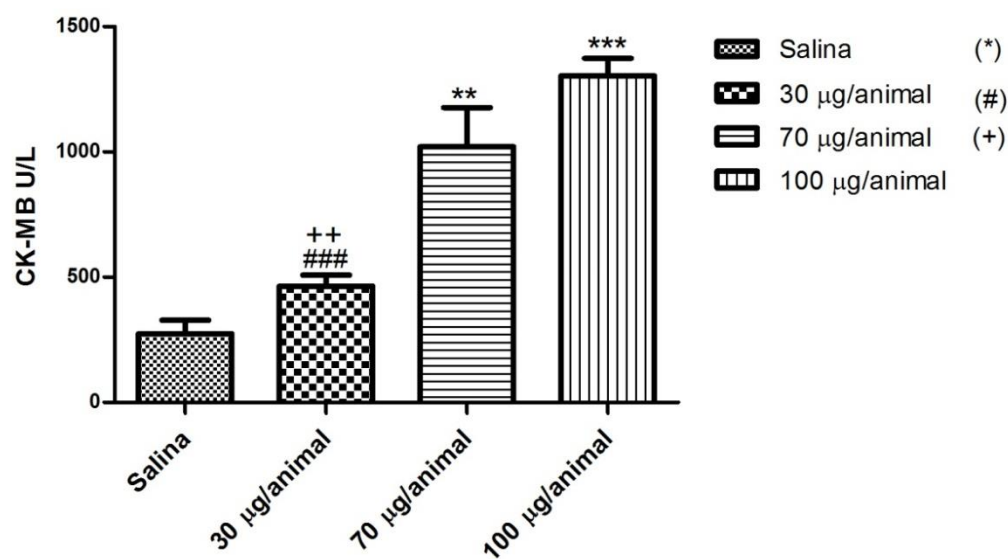






Figura 12. Dosagem de CK-MB em soro de camundongos. Grupo controle negativo  50 μ L de solução salina. Grupos teste:  30 μ g do PME dissolvidos em 50 μ L de solução salina,  70 μ g do PME dissolvidos em 50 μ L de solução salina,  100 μ g do PME dissolvidos em 50 μ L de solução salina. Os pontos representam a média \pm SEM (n = 5/grupo). Os dados foram submetidos ao teste ANOVA de uma via seguido do teste T (Tuckey). * Diferenças significativas em relação à salina. * p<0.05 ; ** p<0.01; *** p<0.001. # Diferenças significativas em relação a dose 100 μ g.+ Diferenças significativas em relação à dose de 70 μ g.

5.9. ATIVIDADE GELATINOLÍTICA EM GEL SDS-PAGE, CASEINOLÍTICA, COLAGENÁSICA E ELASTÁSICA

Gelatina, caseína, elastina e colágeno foram usados como substratos para avaliar a atividade proteolítica gerada pelo extrato proteico do ferrão do peixe *P. maculatus*. Os resultados das atividades proteolíticas (atividades caseinolítica, colagenásica e elastásica, após 2 horas de incubação com 100 µg do PME, estão mostrados na tabela 2. O extrato proteico do ferrão do peixe *P. maculatus* não gerou atividade gelatinolítica. O veneno de *Bothrops moojeni* e PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,68 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,7 mM, pH 7,2) foram usados como controle positivo e negativo, respectivamente.

Tabela 2. Valores da média ± erro padrão da média das atividades proteolíticas sob Caseína, Elastina e Colágeno, após 2 horas de incubação com 100 µg do Extrato aquoso do ferrão do peixe *Pimelodus maculatus*.

Atividade Proteolítica	<i>Pimelodus maculatus</i> (100 µg)	<i>Bothrops moojeni</i> (50 µg)
(U / mg)(média ± Desvio padrão)		
	2 h	2 h
Atividade Caseinolítica	154± 2	9140±3
Atividade Elastásica	136±1,52	3800±1,56
Atividade Colagenásia	451,7±1,52	4450±1,55

As atividades proteolíticas sobre caseína, elastina e o colágeno corroboram a presença de enzimas (proteases) no extrato proteico do ferrão do peixe *P. maculatus* com capacidade de degradar ou hidrolisar esses substratos.

PME (100 µg), correspondente à quantidade de proteína presente em um ferrão, gera 154 unidades de atividade enzimática por mg de proteína (U /mg), sobre caseína, após 2 horas de incubação. Mesmo sendo um ensaio inespecífico, permite identificar a presença de proteases no PME (Tabela 2).

PME (100 µg) apresenta atividades de 136 (U /mg) sobre elastina e de 451,66 (U /mg) sobre colágeno, após 2 horas de incubação. Desta forma, pode-se dizer que o extrato proteico do ferrão do peixe *P. maculatus* contém proteases com a capacidade de degradar o colágeno e elastina; proteínas presentes no tecido conjuntivo, cuja degradação pode estar favorecendo a difusão da peçonha no interior do tecido e a permanência da sintomatologia por cerca de 6 a 8 horas nas vítimas.

6. DISCUSSÃO

Constatamos, no presente estudo, que um ferrão possivelmente é capaz de armazenar uma quantidade aproximada de 100 µg de proteína e, dessa forma, simulamos o edema causado por um ferrão com a ausência da ação mecânica do mesmo. Na dose 100 µg de PME, ocorreu surgimento de edema que persistiu por 120 min, tempo da última leitura realizada (Figura 4), demonstrando que o extrato proteico do ferrão é capaz de induzir o edema formado no acidente.

Em envenenamentos causados por bagres em humanos, os sintomas são descritos por dor intensa e inchaço no local do envenenamento, não havendo descrição de óbitos (Haddad Jr e Lastória, 2005 ; Wright, 2009). Segundo um trabalho realizado por Haddad e colaboradores (Haddad Jr *et al.*, 2012), foram observados os sintomas em 39 pescadores que sofreram acidentes por peixes, sendo o *Pimelodus maculatus* um dos peixes com maior ocorrência, no qual os acidentados apresentaram edema em 17,9% dos casos estudados.

Em acidentes causados por mandi, os sintomas instantâneos mais citados são dor intensa, edema e eritema, sendo que o edema persiste por cerca de seis a oito horas (Haddad Jr e Lastória, 2005; Wright, 2009) característico da fase aguda do acidente (Haddad Jr e Martins, 2006). Nossos resultados demonstraram que o edema persistiu após 120 min, sugerindo que, caso fossem realizadas novas leituras, o edema tenderia a diminuir com o transcorrer do tempo.

Os resultados demonstram que a dose de 85 µg do PME /animal possui uma forte ação nociceptiva durante a fase inflamatória do envenenamento (Figura 5), que pode estar relacionado com a persistência da dor por mais de 6 horas nos envenenamentos. Esta dor significativa pode ser causada pela presença de um processo inflamatório gerado pelo PME, além do induzido pela ação mecânica do ferrão.

O extrato proteico do peixe *Pseudoplatystoma fasciatum* produziu um efeito nociceptivo em camundongos injetados com dose maior de 60 µg do extrato, com um ponto máximo do efeito aos 74 s após injeção (Lopes-Ferreira *et al.*, 2014); sugerindo que o extrato aquoso do peixe *P. maculatus* gera um efeito nociceptivo menor ao gerado pelo extrato proteico do peixe *Pseudoplatystoma fasciatum*.

O extrato proteico do peixe *Pseudoplatystoma fasciatum* também apresentou atividade edematogênica com a dose de 30 µg produzindo atividade máximo após 3 horas da injeção em camundongos (Lopes-Ferreira *et al.*, 2014). Esse resultado, quando comparado ao edema induzido pelo extrato proteico do ferrão do peixe *P. maculatus* (Figura 4) sugere que a resposta produzida pela dose de 100 µg deste último gera uma atividade edematogênica mais rápida, com um 100% de edema nos primeiros 15 min.

A permeabilidade vascular é um marcador fundamental para avaliar o estado dos vasos sanguíneos, e seu aumento pode estar relacionado por fatores como estresse, fatores de crescimento endotélio-vascular, fatores de crescimento de fibroblastos e mediadores da inflamação (citocinas, serotonina, histamina ou bradiquinina) (Dvorak, 2005).

Nas condições fisiológicas normais o endotélio é permeável à água e aos íons, e impermeável às proteínas; portanto, na ausência dos estímulos inflamatórios, a albumina está presente somente no fluxo sanguíneo e não no líquido extracelular. O corante Azul de Evans tem a característica de ligar-se à albumina e, portanto, por meio deste ensaio, pode – se determinar a quantidade de perda de proteínas da corrente sanguínea no tecido intersticial (Radu,2012).

Uma característica das reações inflamatórias é o aumento da permeabilidade vascular (Junqueira *et al.*, 2007) e, portanto, avaliar o extrato proteico do ferrão do peixe *P. maculatus* em relação a essas alterações fisiológicas é importante para conhecer melhor o perfil da inflamação que a peçonha pode gerar em um acidente. As doses de 30 µg e 70 µg do PME induziram um incremento significativo na vaso-permeabilidade da cavidade peritoneal de ratos, sendo o maior efeito causado pela dose de 70 µg, após duas horas da injeção (Figura 6).

As alterações na permeabilidade vascular têm sido observadas com diferentes peçonhas de peixes no Brasil. Por exemplo, a peçonha do peixe-sapo (*Thalassophry nenattereri*) induz um aumento na permeabilidade vascular e um drástico incremento principalmente de neutrófilos, 24 horas após a injeção da peçonha, e o influxo de leucócitos a partir do sistema vascular para o espaço peritoneal, o que é considerado como uma manifestação pró-inflamatória (Lima *et al.*, 2003). Similarmente, as peçonhas das arraias *Potamotrygon cf. scobina* e *Potamotrygon gr. orbygnyi* são capazes de aumentar a permeabilidade vascular em ratos (Magalhães *et al.*, 2006).

Estudos realizados por Junqueira e colaboradores (Junqueira *et al.*, 2007) demonstraram que o bagre *Cathorops spixii* aumentou significativamente a permeabilidade vascular nas doses de 12,5, 25, 50 e 100 µg tanto da peçonha como do muco venenoso da pele de maneira dose-dependente, sendo o maior efeito causado pela dose de 100 µg do muco venenoso.

As atividades edematogênicas e nociceptivas estão principalmente relacionadas com as alterações na permeabilidade vascular, sendo essa última um dos indicadores de um processo inflamatório (Brain e Williams, 1985). Portanto, as alterações induzidas no presente estudo são comparáveis às alterações geradas por outras peçonhas de animais aquáticos, mostrando-se que essa peçonha caracterizada por induzir edema e dor, pode também desenvolver um processo inflamatório na dose de 70 µg de PME (Figura 6), que é inferior à quantidade que se estima ter um ferrão.

A inflamação é um processo tissular constituído pela expressão de eventos moleculares, celulares e vasculares que protegem o organismo das agressões físicas, químicas ou biológicas,

destacando-se no processo inflamatório principalmente a inflamação local, a expressão dos mediadores inflamatórios e as alterações vasculares. Os mediadores do processo inflamatório, citocinas e quimocinas, são produzidos no local da inflamação e existe uma correlação entre seus níveis e a severidade do processo inflamatório, desencadeando uma cascata de produtos de genes, geralmente não produzidos em indivíduos saudáveis (Gallin, 1989; Male *et al.*, 1991).

As alterações na permeabilidade vascular nas doses de 30, 70 e 100 µg (Figura 6), o marcado efeito inflamatório na fase II do ensaio de nocicepção na dose de 85 µg (Figura 5) e o edema na dose de 100 µg (Figura 4) gerados pelo extrato proteico do ferrão do peixe *P. maculatus* foi importante para determinar os mediadores inflamatórios que estão envolvidos nestas sintomatologias.

Neste estudo foram avaliados os níveis de IL-1β, IL-6, TNF-α e IL-10 no macerado do tecido de pata de camundongos. Cem µg do PME não geraram a expressão da interleucina TNF-α (dados não apresentados). No entanto, os níveis dos mediadores pró-inflamatórios IL-1β e IL-6 apresentaram um aumento significativo quando comparados ao grupo controle (NaCl), após 6 e 8 horas da injeção (160,84 e 410,07 pg/mL, respectivamente). Estima-se que os níveis de IL-1β e IL-6 voltaram ao normal após 24 horas da injeção (Figura 7 e 8). O mediador anti-inflamatório IL-10 caracterizou-se por ter uma máxima expressão de 189,08 pg/mL após 6 horas da injeção, voltando aos seus níveis normais após 24 horas do tratamento (Figura 9).

Esses resultados podem justificar a permanência da sintomatologia (edema, dor e inflamação) gerada nos envenenamentos com o peixe de estudo de 6 a 8 horas, onde para esses tempos de avaliação, a expressão das interleucinas IL-1β, IL-6 e IL-10 chegaram a seus níveis máximos (Figuras 7, 8, e 9).

Os efeitos inflamatórios gerados pela expressão da interleucina IL-1β levam à liberação de histamina dos mastócitos, levando ao aumento da permeabilidade vascular no local da inflamação (Dinarello, 2000). Portanto, pode-se explicar que as alterações na permeabilidade vascular em conjunto com a formação de edema, em parte, foram mediadas pelo aumento significativo dos níveis de IL-1β na dose de 100 µg do PME.

Adicionalmente, é provável que tenha ocorrido uma ação sinérgica da interleucina IL-6, uma vez que as citocinas são conhecidas pela sua capacidade de induzir a liberação de outras citocinas. O incremento nos níveis de IL-1β estimulam a liberação da interleucina IL-6 entre outros mediadores, magnificando o processo inflamatório. Portanto IL-1β é reconhecida como o fator chave e principal mediador pró-inflamatório responsável pela resposta inflamatória nos organismos (Bird *et al.*, 2002; Huising *et al.*, 2004)

A interleucina IL-10 é a citocina imunossupressora por excelência, inibindo a sínteses das citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 e quimiocinas (Dinarello, 2000). Os níveis de expressão da interleucina anti-inflamatória IL-10 gerada pela dose de 100 μ g do PME caracterizou-se por ter uma máxima expressão de 189,08 pg/mL após 6 horas da injeção (Figura 9). Portanto, a expressão significativa desse tipo de citocina poderia ter inibido a sínteses da TNF- α . Como mediador da resposta inflamatória, a expressão de níveis altos de IL-6 tem sido associada na inibição da expressão de IL-1 β e TNF- α (Jones, 2005), o que caracteriza o papel controverso da IL-6 na sua função pró ou anti-inflamatórias (Asano *et al.*, 1990; Preiser *et al.*, 1991).

Portanto, pode se justificar a ausência da interleucina TNF- α , ante os altos níveis de expressão de IL-6; ou simplesmente o extrato proteico do ferrão do peixe *P. maculatus* não gera um processo inflamatório dependente da expressão e ativação desse mediador inflamatório. A ausência desse mediador inflamatório também foi encontrada por Lopes-Ferreira e colaboradores (Lopes - Ferreira *et al.*, 2014) na avaliação da resposta inflamatória local gerada pelo veneno do peixe *Pseudoplatystoma fasciatum*.

A presença de edema e a dor está associada com a expressão dos mediadores inflamatórios. No caso da dor inflamatória, a expressão de vários mediadores inflamatórios é liberada de minutos até horas em decorrência a um dano tecidual. Bradicinina, proteases, histamina, serotonina, óxido nítrico, citocinas e outros mediadores são liberados pelo fato da formação da ferida e as células imunes que poderiam ser afetadas (Basbaum e Jessell, 2000).

Tem-se reconhecido que os mediadores inflamatórios liberados a partir das células imunes podem contribuir na permanência de uma dor persistente (Marchand *et al.*, 2005). O extrato proteico do ferrão do peixe *P. maculatus* caracterizou-se por induzir um efeito nociceptivo significativo na fase II (Figura 5), e a expressão dos mediadores inflamatórios IL-6, IL-1 β e IL-10 (Figuras 7, 8 e 9). Desta forma, poderia-se dizer que a dor induzida pelo extrato proteico do peixe *P. maculatus* em nossos ensaios e a permanência dessa sintomatologia nos envenenamentos (6-8 horas) são decorrência da dor inflamatória, além da dor gerada pela ação mecânica do ferrão.

Existe uma correlação na atividade edematogênica na dose de 100 μ g do PME e a expressão dos mediadores inflamatórios IL-6, IL-1 β e IL-10, que poderiam justificar que o edema induzido pelo PME é em decorrência ou modulada pela atividade biológica desses mediadores (Figura 13), além da dor e as alterações na permeabilidade vascular observadas.

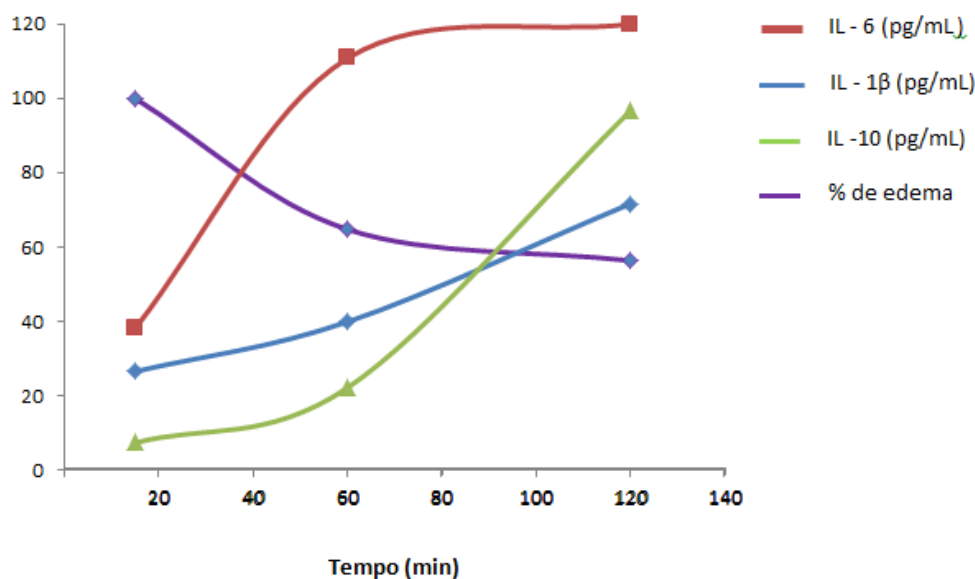


Figura 13. Correlação da formação de edema e a expressão dos mediadores inflamatórios IL-1 β , IL-6 e IL-10 na dose de 100 μ g do PME.

A reação inflamatória local induzida por peixes venenosos brasileiros tem sido avaliada experimentalmente e os resultados podem ser comparáveis aos obtidos neste estudo. Por exemplo, o extrato proteico do bagre da água doce *Pseudoplatystoma fasciatum* caracterizou-se por gerar um efeito inflamatório local, onde os mediadores inflamatórios IL-1 β e IL-6 tiveram um aumento significativo quando comparados ao grupo controle, após duas horas da injeção de 30 μ g do veneno. O mediador TNF- α não foi expresso em momento nenhum do experimento (Lopes - Ferreira *et al.*, 2014). Esses resultados quando comparados aos resultados obtidos com o extrato aquoso do ferrão do peixe *P. maculatus* mostra que eles são semelhantes já que o veneno caracterizou-se por induzir a liberação dos mediadores IL-1 β e IL-6, e não teve efeito nenhum na expressão do mediador TNF- α , além de ser representante da família Pimelodidae.

O veneno do bagre *Pseudoplatystoma fasciatum*, na dose de 30 μ g de proteína, após duas horas da injeção, gerou um aumento dos níveis de IL-1 β (aprox. 350 pg/ml) e IL-6 (aprox. 1100 pg/ml) maiores (Lopes - Ferreira *et al.*, 2014), quando comparados aos níveis de expressão do PME no mesmo tempo de avaliação, sendo que o PME gerou a expressão desse tipo de mediadores inflamatórios após 6 e 8 horas da injeção, respectivamente (Figura 7 e 8).

Portanto, pode-se dizer que nos camundongos injetados com 100 μ g do PME, os mediadores pró-inflamatórios IL-1 β e IL-6 foram expressos sendo a maior expressão da interleucina IL-6 maior que

a de IL-1 β nos experimentos para as duas espécies. Além disso, os mediadores inflamatórios, gerados por ambos os venenos (*P. maculatus* e *Pseudoplatystom fasciatum*) voltaram a seus níveis normais após 24 horas da injeção.

O efeito inflamatório gerado pelas arraias foi avaliado experimentalmente em *Potamotrygon genus*, onde as alterações na permeabilidade vascular e os incrementos de leucócitos e das células aderentes do endotélio estão associados aos efeitos edematogênico e nociceptivo gerados pelo extrato proteico bruto (Magalhães *et al.*, 2006). Os níveis dos mediadores inflamatórios IL-1 β e IL-6 tiveram um aumento significativo quando comparados aos grupos controle, após duas horas da injeção de 100 μ g do extrato proteico da arraia *Potamotrygon cf. henlei* (Monteiro Dos Santos *et al.*, 2011).

Quanto à caracterização da resposta inflamatória local do veneno de peixes venenosos de ambientes marinhos, podemos citar os efeitos encontrados com o extrato proteico bruto do peixe *Cathorops spixii*, quem induziu uma reação inflamatória caracterizada pela expressão das citocinas IL-6, MPC-1 e KC, além do mediador inflamatório lipídico LTB₄. IL-1 β e TNF- α não foram detectados na lavagem peritoneal de camundongos (Junqueira *et al.*, 2007).

Lima e colaboradores (Lima *et al.*, 2003) encontraram que o extrato proteico do peixe *Thalassophryne nattereri* gerou um incremento dos níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF- α para 320, 2500 e 40 pg/pata, respectivamente, sendo estatisticamente significativos quando comparados aos níveis do grupo controle. Pareja-Santos e colaboradores (Pareja - Santos *et al.*, 2009) conferiram o efeito pró-inflamatório do extrato proteico bruto do peixe *Thalassophryne nattereri*, tendo sido evidente a indução de uma lesão crônica. Os níveis de IL-1 β incrementaram-se de 48 horas até 21 dias, após administração do veneno. IL-6 e TNF- α só aumentaram em 21 dias e 48 horas, após administração do veneno, respectivamente.

Comparando-se os efeitos induzidos por *Thalassophryne nattereri* aos induzidos pelo peixe de água doce do presente estudo, pode-se dizer que o aumento dos níveis dos mediadores pró-inflamatórios são bem maiores que os induzidos pelo PME, e a severidade do processo inflamatório é bem maior em decorrência ao incremento e a permanência dos mediadores inflamatórios por até 48 horas. No entanto, tem-se encontrado que o extrato proteico do peixe *Scorpaena plumieri* induz uma resposta inflamatória local caracterizada pela expressão de 38 pg/mL (TNF- α), 1600 pg/mL (IL-6) e 2470 pg/mL (MCP-1) após duas horas da injeção do veneno. Todos os níveis dos mediadores pró-inflamatórios regressaram aos níveis basais após 6 h de administração do veneno (Menezes *et al.*, 2012), tempo menor ao encontrado com o PME.

Finalmente, eventos sintomatológicos como a formação de edema, as alterações na permeabilidade vascular, e a expressão dos mediadores inflamatórios gerados pelo extrato proteico do ferrão do peixe *P. maculatus* caracterizaram a resposta inflamatória local desenvolvida

nos envenenamentos com o peixe, sendo esses eventos comparáveis aos encontrados para outros peixes tanto marinhos como da água doce (Lopes-Ferreira *et al.*, 1998; Sosa - Rosales *et al.*, 2005; Haddad Jr e Martins, 2006; Magalhães *et al.*, 2006; Junqueira *et al.*, 2007; Lopes-Ferreira *et al.*, 2014). Destacando que as diferenças na modulação da resposta inflamatória local e a severidade do processo inflamatório é variável, e dependente da composição bioquímica do veneno para cada espécie.

As alterações eletrocardiográficas induzidas pelo extrato proteico do ferrão do peixe *P. maculatus* foram avaliadas no ensaio coração *in situ* de rã. A dose de 100 µg (quantidade que um ferrão tem, aproximadamente) não induziu alterações na força de contração ou na frequência cardíaca. Com o dobro desta dose, o extrato proteico gerou apenas uma discreta diminuição na força de contração, sem apresentar alterações na frequência cardíaca (Figura 10).

As respostas cardiovasculares induzidas pela maioria dos peixes venenosos nas preparações cardíacas envolvem a atividade de receptores muscarínicos e, algumas vezes, ocorrem por meio de colinomiméticos contidos na peçonha, que modulam indiretamente a via endógena da acetilcolina. Por outro lado, os efeitos positivos parecem ter relação com a atividade dos adrenoreceptores. Respostas não adrenérgicas também podem ser observadas, além de gerar contração do músculo liso e vasodilatação (Church e Hodgson, 2002).

Estudos realizados com extrato proteico de peixes peçonhentos demonstram os efeitos variáveis que elas têm sobre o coração. Por exemplo, o extrato proteico bruto do ferrão do *bagre Heteropneustes fossilis* produz um incremento inotrópico tanto nos corações de sapos quanto nos de cobaias (Datta *et al.*, 1982).

Fração letal e a toxina nomeada “PC” da peçonha do peixe-cão (*Plotosus canius*), causa respostas contráteis em coração de cobaias, uma ação que não é afetada pelo bloqueio dos receptores adrenérgicos ou muscarínicos (Auddy e Gomes, 1996). A peçonha do peixe-escorpião (*Scorpaena guttata*) produz uma resposta bifásica em corações isolados de ratos, uma diminuição inicial seguida de um incremento sustentado na força de contração, indicando que a peçonha atua sobre os receptores muscarínicos e adrenoreceptores (Schaeffer *et al.*, 1971).

De maneira semelhante, a peçonha do peixe-soldado (*Gymnapistes marmoratus*) induz o mesmo efeito, onde a fase negativa é atribuída à atividade em receptores muscarínicos, e a fase positiva à atividade adrenoreceptora (Hopkins e Hodgson, 1998). Além dessa variedade de efeitos serem modulados pela composição da peçonha da espécie, Church e Hodgson (Church e Hodgson, 2002) determinaram que as diferenças observadas também podem ser dependentes do modelo biológico experimental e das concentrações usadas.

Estudos com peçonhas de peixes sobre a atividade cardíaca de coelho mostraram que estas induzem uma fase só de alteração cardiovascular, enquanto que em estudos com outros animais, as respostas foram sempre bifásicas como por exemplo, a peçonha do peixe-pedra (*Synanceia trachynis*), que pode alterar de um efeito vasodilatador para um vasoconstrictor dependendo da concentração avaliada (Church e Hodgson, 2000b).

Os testes realizados sob coração *in situ* de rã confirmaram que o extrato proteico do ferrão do peixe *P. maculatus* tem apenas um discreto efeito sob a força de contração, quando testado numa dose mais elevada que a envolvida no envenenamento. Tendo em conta que os efeitos das toxinas dos bagres são locais, as alterações cardiovasculares não são uma característica do envenenamento por esse tipo de peixes (Haddad Jr, 2000; Haddad Jr, 2004; Haddad Jr e Lastória, 2005; Haddad Jr e Martins, 2006; Dorooshi, 2012).

A quantificação da atividade da Creatina Quinase (CK) e sua isoenzima (CK-MB) no soro humano são uma importante ferramenta na confirmação do diagnóstico do infarto agudo do miocárdio (IAM) e de outras lesões cardíacas. A atividade dessas enzimas indica a necrose miocárdica e, conseqüentemente, de um possível IAM, (Ferreira e Madeira, 2011). A enzima CK encontra-se amplamente distribuída em tecidos musculares e no cérebro, sendo um marcador menos específico de lesão cardíaca, enquanto a isoenzima CK-MB é encontrada principalmente no miocárdio (Wu, 1989).

Este é o primeiro estudo dos efeitos farmacológicos do extrato aquoso do ferrão de *P. maculatus* e, o primeiro que avalia estes parâmetros com extratos proteicos dos bagres. PME, nas doses de 70 µg e 100 µg, foi capaz de aumentar as concentrações séricas tanto de CK ($p < 0.01$ e $p < 0.05$), quanto de CK-MB ($p < 0.001$ e $p < 0.01$) (Figura 11 e 12), indicando uma possível lesão cardíaca e não somente muscular.

Contudo, este não é um sinal clínico clássico do envenenamento em humanos, visto que a atividade da peçonha restringe-se ao local, com dor intensa, eritema e inflamação (Haddad Jr *et al.*, 2012). Como os níveis de CK foram muito elevados, pode-se inferir que ocorra também uma séria e extensa lesão muscular no local da ferida. Uma vez que não houve atividade hemorrágica ou alterações nos tempos de coagulação, mesmo na dose de 100 µg/animal, pode-se inferir que esta sintomatologia não é característica do envenenamento pelo peixe *P. maculatus*.

Além disso, estas alterações não são sinais clínicos do envenenamento clássico causado pelo peixe estudado e não foram descritos em pacientes até o presente momento. A mera presença de uma elevada atividade de CK-MB não indica necessariamente o infarto do miocárdio, de fato a atividade de CK-MB pode ser detectada nas inflamações, e nas doenças musculares degenerativas (Tietz, 1994). Portanto, as lesões musculares primeiro aqui descritas, podem estar

associadas com necrose profunda ocasional e processos inflamatórios intensos, especialmente em grandes traumas causados por ferrões, que pode ferir a musculatura.

Atividade proteolítica tem sido amplamente estudada nos venenos de serpentes (Família Crotalidae) descobrindo-se o importante papel das proteases nas atividades patológicas geradas pelo veneno. Neste aspecto, o veneno dos peixes não é diferente. Tem-se descrito varias atividades enzimáticas nestes venenos, como por exemplo, as peçonhas dos peixes marinhos *Pterios volitans* (Balasubashini *et al.*, 2006), *Notesthes robusta* (Hahn e O'connor), *Thalassophryne nattereri* (Lopes-Ferreira *et al.*, 1998), *Thalassophryne maculosa* (Sosa-Rosales *et al.*, 2005), *Scorpaena plumieri* (Carrijo *et al.*, 2005) e *Synanceia horrida* (Khoo *et al.*, 1992; Garnier *et al.*, 1995).

Em peçonhas de peixes da água doce, a atividade proteolítica tem sido estudada principalmente nas peçonhas das arraias *Potamotrygon motoro* (Magalhães *et al.*, 2008), *Potamotrygon cf. scobina*, *Potamotrygon gr. orbignyi* (Magalhães *et al.*, 2006) e *Potamotrygon falkneri* onde foram identificadas atividade gelatinolítica, além de atividade hyaluronidásica (Haddad Jr *et al.*, 2004).

As enzimas proteolíticas podem facilitar a absorção e difusão do veneno nos tecidos das vitimas, favorecendo os efeitos locais e sistêmicos observados nos envenenamentos, cujo evento pode depender da ação biológica das proteases presentes no veneno (Halstead, 1951; Haddad Jr *et al.*, 2003, Da Silveira *et al.*, 2002). Gomes e colaboradores (Gomez *et al.*, 2001) descreveram uma correlação direta entre a difusão do veneno no sítio local do envenenamento favorecido pela expressão de proteases e a reação inflamatória.

Lima e colaboradores (Lima *et al.*, 2003) demonstraram que o extrato proteico do ferrão do peixe *Thalassophryne nattereri* gerou um aumento significativo dos níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Pareja-Santos e colaboradores (Pareja – Santos *et al.*, 2009) demonstraram que as patas dos camundongos injetados com o extrato do mesmo peixe tiveram a estrutura da matriz extracelular alterada em decorrência à ativação de metaloproteinases da matriz extracelular (MMP-2 e MMP-9), sendo evidente uma diminuição das fibras de colágeno durante a fase de recuperação do tecido no local da lesão.

Portanto, era importante avaliar a presença de proteases no extrato aquoso do peixe *P. maculatus* que possam favorecer o envenenamento e estarem associadas com a duração da sintomatologia do mesmo.

Nos ensaios realizados, encontramos que o extrato proteico do ferrão do peixe *P. maculatus* tem atividade enzimática sobre caseína (154 ± 2 U/mg), elastina ($136 \pm 1,52$ U/mg) e colágeno ($451,66 \pm 1,52$ U/mg) após duas horas de incubação. o que possivelmente pode estar favorecendo a permanência de 6 a 8 horas na sintomatologia descrita no envenenamento (Tabela 2).

As arraias da água doce *Potamotrygon cf. scobina* e *Potamotrygon gr. orbigny*, apresentaram atividade proteolítica sobre caseína de $3,7 \pm 0,9$ U/mg e $5,0 \pm 1,3$ U/mg, respectivamente (Magalhães *et al.*, 2006); atividade similar à gerada pelo extrato proteico dos peixes marinhos *Thalassophryne maculosa* $4,4 \pm 1,5$ U/mg (Sosa-Rosales *et al.*, 2005) e *Thalassophryne nattereri* (Lopes-Ferreira *et al.*, 1998) a uma dose de 100 µg do extrato proteico do veneno, considerada uma atividade proteolítica discreta para esse substrato, de acordo com o critério de Sosa-Rosales e colaboradores (Sosa-Rosales *et al.*, 2005).

Sivan e colaboradores (Sivan *et al.*, 2007) avaliaram a atividade proteolítica do extrato proteico do ferrão do peixe *Scatophagus argus* sobre caseína, onde 50 µg do extrato proteico gerou $3,74 \pm 0,3$ U/mg de atividade. O extrato proteico do peixe *P. maculatus* (100 µg) produziu uma atividade proteolítica maior (154 ± 2 U/mg) quando comparado aos outros peixes estudados.

Dor, edema, eritema e necrose são os sintomas clínicos gerados pelos acidentes com arraias de água doce, e esses eventos envolvem alterações da matriz extracelular; sendo as enzimas presentes no veneno dos animais responsáveis pelo efeito (Haddad Jr *et al.*, 2004). Estudos realizados por Lopes-Ferreira e colaboradores (Lopes-Ferreira *et al.*, 2002) demonstraram que as proteases presentes no veneno do peixe marinho *Thalassophryne nattereri* geram uma forte ação citolítica sob plaquetas e células endoteliais; possivelmente responsável pela hemorragia, e favorecendo a difusão do veneno nos tecidos adjacentes.

O extrato proteico da arraia *P. falkneri* contém proteases que degradam caseína, gelatina e fibrinogênio, sendo a atividade proteolítica menor que a gerada pela arraia *D. guttata*. Esses resultados sugerem que as proteases degradam os componentes presentes na matriz extracelular, favorecendo o estabelecimento da lesão local, e em decorrência, geram uma reação inflamatória com a liberação de mediadores envolvidos na nocicepção (Barbaro *et al.*, 2007).

Esta atividade biológica não é exclusiva desses tipos de animais, mas também é uma atividade que tem sido descrita para outros animais venenosos (Tan e Ponnudurai, 1992; Birkedal - Hansen *et al.*, 1993; Veiga *et al.*, 2000; Haddad Jr *et al.*, 2004; Lira *et al.*, 2007). Portanto, é evidente que as proteases têm como principal alvo induzir alterações na matriz extracelular contribuindo numa forte lesão muscular e a permanência da sintomatologia nos envenenamentos.

A matriz extracelular está composta principalmente por proteínas glicosaminoglicanas, proteoglicanas e glicoproteínas. Cada uma delas executa funções de forma integrada com as outras; estabelecendo a matriz extracelular como um verdadeiro complexo funcional. O colágeno e a elastina são as proteínas mais abundantes da matriz extracelular responsáveis pela resistência e elasticidade do tecido, constituindo, assim, a arquitetura de matriz extracelular (Alberts *et al.*, 1989).

O extrato proteico do peixe *P. maculatus* gerou uma forte atividade proteolítica sobre o colágeno e elastina (Tabela 2). Desta maneira, pode-se dizer que as proteases presentes no extrato proteico tem a capacidade de degradar proteínas estruturais do tecido conjuntivo, facilitando a difusão e absorção da peçonha no envenenamento, a permanência da sintomatologia, e a reação inflamatória; além dos efeitos nocivos na matriz extracelular induzido pela ação mecânica do ferrão.

Portanto, a atividade proteolítica gerada pelo extrato proteico do ferrão do peixe *P. maculatus* se soma às outras atividades proteolíticas encontradas em outros organismos, refletindo a importância das proteases no envenenamento e o importante papel que eles desenvolvem na sintomatologia.

O tratamento local utilizado para tentar diminuir a sintomatologia gerada pelo envenenamento com o peixe *P. maculatus* é submergir a parte do corpo afetada na água quente por alguns minutos (Haddad Jr, 2004). A temperatura como fator terapêutico caracteriza-se por aumentar a extensibilidade do tecido conectivo, diminuir a rigidez articular, além dos efeitos analgésicos e anti-inflamatórios (Schmidt e Simon, 2001). Portanto, se justifica o uso de água quente como tratamento que possa se contrapor à forte dor, edema e à inflamação característica do envenenamento pelo peixe de estudo, aproveitando as propriedades analgésicas e anti-inflamatórias que a temperatura estimula.

Além disso, o que representa um dilema para o desenvolvimento de pesquisas com venenos de animais aquáticos é labilidade ao calor que apresentam os compostos contidos na peçonha (Schaeffer *et al.*, 1971). Portanto um aumento da temperatura pode levar à desnaturação das proteases presentes no PME e, assim, diminuir a difusão delas no tecido evitando um grau de envenenamento maior, já que a degradação de compostos da matriz extracelular como elastina e colágeno; onde as proteases presentes no PME tiveram um efeito maior.

7. CONCLUSÕES

Estima-se que um ferrão do peixe *Pimelodus maculatus* contém aproximadamente 100 µg de proteína e, possivelmente, essa é a quantidade máxima envolvida no envenenamento.

O PME é capaz de induzir a formação de edema, dor, aumento da permeabilidade vascular e expressão de mediadores pró e anti-inflamatórios indicando a presença do processo inflamatório complexo. Não se verificou, no entanto, atividade hemorrágica ou alterações nos tempos de protrombina e tromboplastina parcial ativada indicando que o PME não causa alterações no sistema hemostático.

O extrato aquoso do ferrão do peixe *P. maculatus* gera uma discreta alteração cardiovascular (efeito inotrópico negativo) em anuros a uma dose duas vezes maior àquela injetada no envenenamento por um ferrão. Entretanto, as doses de 70 e de 100 µg foram capazes de aumentar as concentrações séricas tanto de CK, quanto de CK-MB em camundongos, indicando uma possível lesão cardíaca, além da lesão muscular. Porém, tais alterações não são um sinal clínico clássico do envenenamento causado pelo peixe estudado.

O extrato proteico do ferrão do peixe *P. maculatus* apresenta atividade proteolítica sobre as enzimas caseína, elastina e colágeno; evidenciando a presença de proteases no extrato proteico que podem estar envolvidas na sintomatologia no envenenamento.

8. PERSPECTIVA

Identificar os componentes do extrato proteico do ferrão do peixe *Pimelodus maculatus* responsáveis pelos efeitos encontrados no envenenamento e as atividades proteolíticas avaliadas; e assim estabelecer o possível mecanismo de ação biológica da formação do edema e o tipo de proteases que tem a capacidade de degradar os substratos aqui avaliados.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B.; BRAY, D.; ROBERTS, K.; WATSON, J. Cell adhesion, cell junctions and the extracellular matrix. In *Molecular Biology of Cell*, 2ª ed, p. 791-836. 1989.
- ALBUQUERQUE, M.; SANTOS, M.; MONTEIRO, C.; MARTINS, A.; EDERLI, N.; BRASIL-SATO, M. The endoparasitic helminths of *Pimelodus maculatus* Lacepede, 1803 (Siluriformes, Pimelodidae) from the two localities (Lagoon and gutter of the River) of the Guandu River, State of Rio de Janeiro, Brazil. *Revista brasileira de parasitologia veterinaria: Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria*, p. 113-119. 2008.
- ALDRED, B.; ERICKSON, T.; LIPSCOMB, J. Lionfish envenomations in an urban wilderness. *Wilderness Environ*, p. 291–296. 1996.
- AMÂNCIO, C.O.G. Aspectos socioeconômicos do desenvolvimento do Pantanal Sul. *Agricultura Tropical: Quatro décadas de inovações tecnológicas, institucionais e políticas*. Corumbá: 1ª Ed, p. 503-517. 2008.
- ARANTES, F.; BORÇATO, F.; SATO, Y.; RIZZO, E.; BAZZOLI, N. Reproduction and embryogenesis of the mandi-amarelo catfish, *Pimelodus maculatus* (Pisces, Pimelodidae) in captivity. *Anatomia, histologia, embryologia*, p. 30-39.2013.
- ASANO, S.; OKANO, A.; OZAWA, K.; NAKAHATA, T.; ISHIBASHI, T.; KOIKE, K.; KIMURA, H.; TANIOKA, Y.; SHIBUYA, A.; HIRANO, T.; KISHIMOTO, T.; TAKAKU, F.; AKIYAMA, Y. In vivo effects of recombinant human Interleukin-6 in Primates: stimulated production of Platelets. *Blood* 75, p. 1602–1605. 1990.
- AUDDY B.; GOMES, A. Indian catfish (*Plotosus canius*, Hamilton) venom. Occurrence of lethal protein toxin (toxin- PC). *Adv. Exp. Med. Biol*, p. 225–229. 1996.
- AUDDY, B.; ALAM, M.I.; GOMES, A. Pharmacological actions of the venom of the Indian Catfish (*Plotosus caninus*, Hamilton). *Indian Journal of Medical Research*, p. 47-51. 1994.
- BAACK, B.R.; KUCAN, J.O.; ZOOK, E.G.; RUSSELL, R. Hand infections secondary to catfish spines: case reports and literature review. *J Trauma*, p. 1432–1436. 1991.
- BALASUBASHINI, M.S.; KARTHIGAYAN, S.; SOMASUNDARAM, S.T.; BALASUBRAMANAN, T.; MENON, V.P. In vivo and in vitro characterization of the biochemical and pathological changes induced by lionfish (*Pterios volitans*) venom in mice. *Toxicol Mech Methods*, p. 525-31. 2006.
- BARBARO, K.C.; LIRA, M.S.; MALTA, M.B.; SOARES, S.L.; GARRONE NETO, D.; CARDOSO, J.L.; SANTORO, M.L.; HADDAD JUNIOR, V. Comparative study on extracts from the tissue covering the stingers of freshwater (*Potamotrygon falkneri*) and marine (*Dasyatis guttata*) stingrays. *Toxicon*, p. 676–87. 2007.
- BASBAUM, A.I.; JESSELL, T.M. The perception of pain, *Principles of Neural Science*, p. 473–491. 2000.
- BENNEMANN, S.T.; SHIBATTA, O.A.; GARAVELLO, J.C. Peixes do rio Tibagi: uma abordagem ecológica. Londrina, p. 62. 2000.
- BIRD, S.; ZOU, J.; WANG, T.; MUNDAY, B.; CUNNINGHAM, C.; SECOMBES, C.J. Evolution of interleukin-1 beta. *Cytokine Growth Factor Rev*. 13, p. 483–502. 2002.

- BIRKEDAL-HANSEN, H.; MOORE, W.G.; BODDEN, M.K.; WINDSOR, L.J.; BIRKEDAL-HANSEN, B.; DECARLO, A.; ENGLER, J.A. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, p. 197–250. 1993.
- BLOMKALNS, A.L.; OTTEN, E.J. Catfish spine envenomation: a case report and literature review. *Wilderness Environ Med.*, p. 242–246. 1999.
- BOUTROS, F.S.; RIVALDI, J.D.; GAMBARATO, B.C.; TRESINARI DOS SANTOS, D.; SILVÉRIO DA SILVA, S. Importância das citocinas no sistema imunológico parte II: extração, purificação e análise. *Revista Analytica*, p. 32-34. 2008.
- BRAIN, S.; WILLIAMS, T. Inflammatory oedema induced by synergism between calcitonin gene-related peptide (CGRP) and mediators of increased vascular permeability. *Br J Pharmacol*, p. 855–860. 1985.
- BROWN, D. A.; PASSMORE, G. M. Some new insights into the molecular mechanisms of pain perception. *The Journal of Clinical Investigation*, p. 1380-1383. 2010.
- CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MALAQUE, C. M. S.; HADDAD, JR.V. Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo. 2004.
- CARLSON, R.W.; SCHAEFFER, R.C. JR.; LA GRANCE, R.G.; ROBERTS, C.M.; RUSSELL, F.E. Some pharmacological properties of the venom of the scorpionfish *Scorpaena guttata*. *Toxicon*, p. 379-391. 1971.
- CARRIJO, L. C.; ANDRICH, F.; DE LIMA, M. E.; RICHARDSON, M.; FIGUEIREDO, S. G. Biological properties of the venom from the scorpionfish (*Scorpaena plumieri*) and purification of a gelatinolytic protease. *Toxicon*, p. 843-850. 2005
- CARVALHO, M. R. Family Potamotrygonidae (river stingrays). Checklist of the freshwater fishes of south and central América. Editora:Edipucrs, Porto Alegre, p. 22-28. 2003.
- CEMIG; CETEC. Guia ilustrado de peixes da Bacia do Rio Grande. Companhia Energética de minas gerais. Fundação centro tecnológico de Minas Gerais. Belo Horizonte, p. 144. 2000.
- CHAN, T.Y.; TAM, L.S.; CHAN, L.Y. Stonefish sting: an occupational hazard in Hong Kong. *Ann. Trop. Med. Parasitol*, Hong Kong, p. 675–676. 1996.
- CHARVET-ALMEIDA, P.; GÓES DE ARAÚJO, M.L.; ROSA, R. S.; RINCÓN, G. Neotropical Freshwater Stingrays: diversity and conservation status. *Shark News*, p. 47-51. 2002.
- CHAVIRA, Jr. R.; BURNETT, T.J.; HAGEMAN, J.H. Assaying proteinases with azocoll. *Analytical Biochemistry*. Richmond, p. 136-446. 1984.
- CHURCH, J. E.; HODGSON, W. C. The pharmacological activity of fish venoms. *Toxicon*, p. 1083-1093. 2002.
- CHURCH, J.E.; HODGSON, W.C. Evidence for the presence of a cholinomimetic in the venom of the stonefish (*Synanceia trachynis*). *Proc. Aust. Soc. Clinical and Experimental. Pharmacology and Toxicology*, p. 90. 2002a.
- CHURCH, J.E.; HODGSON, W.C. Adrenergic and cholinergic activity contributes to the cardiovascular effects of lionfish (*Pterois volitans*) venom. *Toxicon*, p. 787-796. 2002b.

- CHURCH, J.E.; HODGSON, W.C. Dose-dependent cardiovascular neuromuscular effects of stonefish (*Synanceja trachynis*) venom. *Toxicon*, p. 391–407. 2000b.
- CUMMINS T. R.; RUSH, A. M. Voltage-gated sodium channel blockers for the treatment of neuropathic pain. *Expert Rev Neurother*, p. 1597-1612. 2007.
- DA SILVEIRA, R.B.; DOS SANTOS FILHO, J.F.; MANGILI,O.C.; VEIGA,S.S.;GREMSKI, W.; NADER, H.B.; VON DIETRICH, C.P. Identification of proteases in the extract of venom glands from brown spiders. *Toxicon*, p. 815-822. 2002.
- DATTA, A.; GOMES, A.; SARANGI, B.; KAR, P.; LAHIRI, S. Pharmacodynamic actions of crude venom of the Indian catfish *Heteropneustes fossilis*. *The Indian journal of medical research*, p. 892. 1982.
- DINARELLO, C. A. Proinflammatory cytokines. *Chest*, Denver, CO, p. 503-508. 2000.
- DOROOSHI, G. Catfish stings: A report of two cases. *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*, p. 578. 2012.
- DVORAK, A. Mast cell-derived mediators of enhanced microvascular permeability, vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, histamine, and serotonin, cause leakage of macromolecules through a new endothelial cell permeability organelle, the vesiculo-vacuolar organelle. *Chem Immunol Allergy*, p. 185-204. 2005.
- FACÓ, P. E.; BEZERRA, G. P.; BARBOSA, P. S. F.; MARTINS, A. M. C. ; GUIMARAES, J. A. ; FERREIRA, M. L. ; MONTEIRO, H. S. A. Epidemiology of the injuries caused by *Thalassophryne nattereri* (niquim) in Ceara State (1992---2002). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, p.479-482. 2005.
- FENNER, P.J. Marine envenomation: an update presentation on the current status of marine envenomation first aid and medical treatments. *Emergency Medicine*, p. 295–302. 2000.
- FERRARIS, Jr. C. J. Checklist of catfishes, recente and fóssil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. *Zootaxa*, p. 1-628. 2007.
- FERREIRA, A. M. C.; MADEIRA, M. A dor torácica na sala de emergência: uma revisão da literatura. *Revista Interdisciplinar NOVAFAPI*, p. 50-56. 2011.
- FIGUEIREDO, S.G.; ANDRICH, F.; LIMA, C.; LOPES-FERREIRA, M.; HADDAD JR. V. Venomous fish: a brief overview. In: *Animal toxins. State of the art. Perspectives on health and biotechnology*, Editora UFMG, Belo Horizonte, P. 73-95. 2009.
- FOWLER, H.W. Os peixes de água doce do Brasil. *Archos Zool*, p. 405-625. 1951.
- GALLIN, J.I. Inflammation. En: Paul, WE. (Ed.) *Fundamental Immunology*. New York: Raven Press, p. 721-733. 1989.
- FROESE, R; PAULY, D. FishBase (www.fishbase.org). World wide web electronic publication, 2012.
- GARNIER, P.; GROSCLAUDE, J.M.; GOUDEY, P. F.; GERVAT, V.; GAYRAL, P.; JACQUOT, C.; PERRIÈRE, C. Presence of norepinephrine and other biogenic amines in stonefish venom. *J. Chromat. B: Biomed*, p. 364–369. 1996.

- GARNIER, P.; GOUDEY, P. F.; BRETON, P.; DEWULF, C.; PETEK, F.; PERRIÈRE, C. Enzymatic properties of the venom of the stonefish (*Synansea verrucosa* Bloch and Schneider, 1801) venom and purification of a lethal, hypotensive and cytolytic factor. *Toxicon*, p. 143-155. 1995.
- GARRONE, N.D.; HADDAD, JR.V. Acidentes por arraias. *Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. Editora: Sarvier 2ª ed, São Paulo, p. 295-305. 2009.
- GARRONE NETO, D.; CORDEIRO, R. C.; HADDAD JR, V. Acidentes do trabalho em pescadores artesanais da região do Médio Rio Araguaia, Tocantins, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, Campinas, p. 795-803. 2005.
- GHOLAMALI, D. Catfish sting: A report of two cases. *Journal of research in medical science*, p. 578-581. 2012.
- GIORDANO, J. The neurobiology of nociceptive and anti-nociceptive systems. *Pain Physician*, P. 277-290. 2005.
- GOMEZ, H.F.; GREENFIELD, D.M.; MILLER, M.J. ;WARREN, J. S. Direct correlation between diffusion of *Loxosceles reclusa* venom and extent of dermal inflammation. *Acad, emerg. med*, p. 309 – 314. 2001.
- GRUND, L. Z. Papel das citocinas IL-5 e IL-17A na diferenciação de células produtoras de anticorpos de vida longa (ASC) induzida pelo veneno do peixe *Thalassophryne nattereri*. Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo, São Paulo. 2009.
- GWEE, M. C. E.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; YUEN, R.; KHOO, H. E.; LOW, K. S. Y. A review of stonefish venoms and toxins. *Pharmacology & Therapeutics*, p. 509-528. 1994.
- HAAVALDSEN, R.; FONNUM, F. Weever venom. *Nature*, p. 286–287. 1963.
- HADDAD J.J. On the enigma of pain and hyperalgesia: a molecular perspective. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, p. 217-224. 2007.
- HADDAD JR. V.; CARDOSO, J .L.; GARRONE NETO, D. Injuries by marine and freshwater stingrays: history, clinical aspects of the envenomations and current status of a neglected problem in Brazil. *The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, p. 16. 2013.
- HADDAD, JR. V.; FÁVERO, L.J.E.; RIBEIRO, A.H.F.; DA COSTA, A.B.; DE CASTRO, I. P.G.A.; COSTA, M. R.; BORGHINI, P.G.; FUJIIJUN, R.; RODOLFO, B. V.; DOMINGOS, G. N. Trauma and envenoming caused by stingrays and other fish in a fishing community in Pontal do Paranapanema, State of São Paulo, Brazil: epidemiology, clinical aspects, and therapeutic and preventive measures. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, p. 238-242. 2012.
- HADDAD JR V. *Animais aquáticos potencialmente perigosos no Brasil: guia médico e biológico*. Editora Roca, 2008.
- HADDAD JR, V.; MARTINS, I. A. Frequency and gravity of human envenomations caused by marine catfish (suborder siluroidei): a clinical and epidemiological study. *Toxicon*, p. 838-843. 2006.
- HADDAD, JR. V.; LASTÓRIA, J. C. Acidentes por mandijubas (mandis-amarelos): aspectos clínicos e terapêuticos; Accidents for mandijubas (mandis-yellow): clínicos and terapêuticos aspects. *Diagn. Tratamento*, p. 132-133. 2005.

- HADDAD, JR. V. Infecções cutâneas e acidentes por animais traumatizantes e venenosos ocorridos em aquários comerciais e domésticos no Brasil: descrição de 18 casos e revisão do tema Cutaneous infections and injuries caused by traumatic and venomous animals which occurred in domestic and commercial aquariums in Brazil: a study of 18 cases and an overview of the theme*. *An Bras Dermatol*, p. 157-167. 2004.
- HADDAD, JR. V.; GARRONE NETO, D.; PAULA NETO, J.B.; LUNA MARQUES, F.P.; BARBARO, K.C. Freshwater stingrays: study of epidemiologic, clinic and therapeutic aspects based on 84 envenomings in humans and some enzymatic activities of the venom. *Toxicon*, p. 287-294. 2004.
- HADDAD, JR.V.; MARTINS, I.A.; MAKYAMA, H. Injuries caused by scorpionfishes (*Scorpaena plumieri* Bloch, 1789 and *Scorpaena brasiliensis* Cuvier, 1829) in the Southwestern Atlantic Ocean (Brazilian coast): epidemiologic, clinic and therapeutic aspects of 23 stings in humans. *Toxicon*, p. 79–83. 2003.
- HADDAD, JR. V. Animais aquáticos de importância médica no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, p. 591-597. 2003.
- HADDAD, Jr. V. Atlas de animais aquáticos perigosos do Brasil. Guia médico de identificação e tratamento de acidentes, P. 145. 2000.
- HAHN, S.T; O'CONNOR, J.M. An investigation of the biological activity of bullrout (*Notesthes robusta*) venom. *Toxicon*, p. 79-89. 2000.
- HALSTEAD,B.W. Venomous Fish. In: *Venomous Animals and Their Venoms*. Bucherl, W. e Buckley, E. E. (Ed.). *Academis Press*, p.587-626. 1971.
- HOPKINS, S. J. The pathophysiological role of cytokines. *Legal Medicine*, p. 45-57. 2003.
- HOPKINS, B. J.; HODGSON, W. C. Cardiovascular studies on venom from the soldierfish (*Gymnapistes marmoratus*). *Toxicon*, p. 973-983. 1998.
- HOPKINS, B.J.; HODGSON, W.C.; SUTHERLAND, S. K. An in vitro pharmacological examination of venom from the soldierfish *Gymnapistes marmoratus*. *Toxicon*, p. 1001-1011. 1997.
- HUANG, G.; GOLDSTEIN, R.; MILDVAN, D. Catfish spine envenomation and bacterial abscess with *Proteus* and *Morganella*: a case report. *Journal of Medical Case Reports*, p. 1-5. 2013.
- HUISING, M.O.; STET, R.J.; SAVELKOUL, H.F.; VERBURG-VAN KEMENADE, B.M. The molecular evolution of the interleukin-1 family of cytokines: IL-18 in teleost fish. *Dev. Comp. Immunol*, p. 395–413. 2004.
- HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mic: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*, p. 103-114. 1987.
- IHERING, R.V.;WRIGHT, S. Fisheries investigations in Northeast Brazil. *Transaction of the américa fisheries Society*, p. 267-271. 1935.
- JONES, S.A. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J. Immunol*, p. 3463–3468. 2005.
- JUNQUEIRA, M. E. P.; GRUND, L. Z.; ORIII, N. M.; SSARAIVA, T. C.; DE MAGALHÃES LOPES, C. A.; LIMA, C.; LOPES-FERREIRA, M. Analysis of the inflammatory reaction induced by the catfish (*Cathorops spixii*) venoms. *Toxicon*, p. 909-919. 2007.

- KASDAN, M.L.; KASDAN, A.S.; HAMILTON, D.L. Lionfish envenomation. *Plastical and Reconstruction Surgery*, p. 613–614. 1987.
- KHOO, H. E. Bioactive proteins from stonefish venom. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, p. 802-806. 2002.
- KHOO, H.E.; YUEN, R.; POH, C.H.; TAN, C.H. Biological activities of *Synanceja horrida* (Stonefish) venom. *Natural Toxins*, p. 54–60. 1992.
- KIZER, K. W.; MCKINNEY, H. E.; AUERBACH, P. S. Scorpaenidae envenomation. *The journal of the American Medical Association*, p. 807-810. 1985.
- KUNITZ, M. J. Crystalline soybean trypsin II. General properties. *Gen Physiology*, p. 291-310. 1947.
- LACEPÈDE, B. G. E. *Histoire naturelle des poissons. Hist. Nat. Poiss*, p. 323. 1803.
- LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal models of nociception. *Pharmacological reviews*, p. 597-652. 2001.
- LIMA, C.; CLISSA, P. B.; PIRAN-SOARES, A. A.; TANJONI, I.; MOURA-DA-SILVA, M. M.; LOPES-FERREIRA, M. Characterization of local inflammatory response induced by *Thalassophryne nattereri* fish venom in a mice model tissue injury. *Toxicon*, p. 499-507. 2003.
- LIRA, M.S.; FURTADO, M.F.; MARTINS, L.M.P.; LOPES-FERREIRA, M.; SANTORO, M.L.; BARBARO, K.C. Enzymatic and immunochemical characterization of *Bothrops insularis* venom and its neutralization by polyspecific *Bothrops* antivenom. *Toxicon*, p. 982–994. 2007.
- LOPES-FERREIRA, M., GOMES, E.M., BRUNI, F.M., FERREIRA, M.J., CHARVET, P., LIMA, C. First report of interruption of mast cell degranulation and endothelial cells activation by anti-inflammatory drugs controlling the acute response provoked by *Pseudoplatystoma fasciatum* fish venom. *Toxicon*, p. 237-248. 2014.
- LOPES-FERREIRA, M. ; EMIM, J. A.; OLIVEIRA, V.; PUZER, L.; CEZARI, M. H.; ARAUJO, M. D. A. ; JULIANO, L.; LAPA, A. J., SOUCCAR, C.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Kininogenase activity of *Thalassophryne nattereri* fish venom. *Biochemical Pharmacology*, p. 2151-2157. 2004.
- LOPES-FERREIRA, M.; MOURA-DA-SILVA, A.M.; PIRAN-SOARES, A.A.; ÂNGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; FARSKY, S.H.P. Hemostatic effects induced by *Thalassophryne nattereri* fish venom: a model of endothelium-mediated blood flow impairment. *Toxicon*, p. 1141–1147. 2002.
- LOPES-FERREIRA, M.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; MOTA, I.; TAKEHARA, H. A. *Thalassophryne nattereri* fish venom: biological and biochemical characterization and serum neutralization of its toxic activities. *Toxicon*, p. 405-410. 1998.
- LOWRY, O.; ROSEBROUGH, N.; FARR, A.; RANDALL, R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem*, p. 265. 1951.
- MAGALHÃES, K.W.; LIMA, C.; PIRAN-SOARES, A.A.; MARQUES, E.E.; HIRUMA-LIMA, C.A.; LOPES-FERREIRA, M. Biological and biochemical properties of the Brazilian *Potamotrygon* stingrays: *Potamotrygon* cf. *scobina* and *Potamotrygon* gr. *orbigny*. *Toxicon*, p. 575–583. 2006.
- MAGALHÃES, M.R.; DA SILVA, N.J.; ULHOA JR, C.J. A hyaluronidase from *Potamotrygon motoro* (freshwater stingrays) venom: isolation and characterization. *Toxicon*, p. 1060–1067. 2008.

- MAGALHÃES, M.R. Estudos bioquímicos do veneno de raias *Potamotrygon motoro* (Chondrichthyes: Dasyatidae, Potamotrygoninae)—Purificação e caracterização de uma hialuronidase. Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás. 2001.
- MALE, D.K.; CHAMPION, B. ; COOKE, A. ; OWEN, M. Cell traffic and inflammation. En: *Advance Immunology*. New York : 2ª ed. Ed Gower London.1991.
- MARCHAND, F.; PERRETTI, M.; McMAHON, S.B. Role of the immune system in chronic pain, *Nat. Rev. Neurosci*, p. 521–532. 2005.
- MARETC, Z. Fish venoms In: Tu, A.T., (Ed.), *Handbook of Natural Toxins: Marine Toxins and Venoms*, Marcel Dekker inc, New York, p. 445–477. 1988.
- MEIER, J.; WHITE, J. *Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons*. CRC Press, p. 27-176. 1995.
- MENEZES, T.N.; CARNIELLI, J.B.T.; GOMES, H.L.; PEREIRA, F.E.L.; LEMOS, E.M.; BISSOLI, N.S.; LOPES-FERREIRA, M.; ANDRICH, F.; FIGUEIREDO, SG. Local inflammatory response induced by scorpionfish *Scorpaena plumieri* venom in mice. *Toxicon*, p. 4-11. 2012.
- MONTEIRO DOS SANTOS, J.; CONCEIÇÃO, K.; SEIBERT, C.S.; MARQUES, E.E; SILVA JR, P.I.; SOARES, A.B.; LIMA, C.; LOPES-FERREIRA, M. Studies on pharmacological properties of mucus and sting venom of *Potamotrygon cf. henlei*. *International Immunopharmacology*, p. 1368–1377. 2011
- MORTARI, M. R.; DO COUTO, L. L.; DOS ANJOS, L. C.; MOURÃO, C. B. F.; CAMARGOS, T. S.; VARGAS, J. A. G.; OLIVEIRA, F. N.; GATI, C. D. C.; SCHWARTZ, C. A.; SCHWARTZ, E. F. Pharmacological characterization of *Synoeca cyanea* venom: An aggressive social wasp widely distributed in the Neotropical region. *Toxicon*, p. 163-170. 2012.
- MOURÃO, C. B. F.; OLIVEIRA, F. N.; ARENAS, C. J.; DUQUE, H. M.; GONÇALVES, J. C.; MACÊDO, J. K.; GALANTE, P.; SCHWARTZ, C. A.; MORTARI, M. R.; ALMEIDA SANTOS, M. D. F. M. Venomic and pharmacological activity of *Acanthoscurria paulensis* (Theraphosidae) spider venom. *Toxicon*, p. 129 -138. 2012.
- NAUGHTON, M.; SANGER, F. Purification and specificity of pancreatic elastase. *Biochemical Journal*, p. 156-163.1961.
- NELSON, J. S. *Fishes of the World*. John Wiley & Sons, 2006. ISBN 047175644X.
- NEMZEK, J. A.; SIDDIQQUI, J.; REMICK, D. G. Development and optimization of cytokine ELISAs using commercial antibody pairs. *J. Immun. Method*, p. 149-157. 2001.
- NGET-HONG, T; PONNUDURAI, G. Comparative study of the enzymatic, hemorrhagic, procoagulant and anticoagulant activities of some animal venoms. *Comp.Biochem.Physiol*, p. 299-302. 1992.
- NIKAI, T.; MORI, N.; KISHIDA, M.; SUGIHARA, H.; TU, A. T. Isolation and biochemical characterization of hemorrhagic toxin from the venom of *Crotalus atrox* (Western Diamondback Rattlesnake). *Archives of biochemistry and biophysics*, p. 309-319. 1984.
- NONATO, E. F.; HADDAD, JR. V.; MALAQUE, C. M. S. Acidentes por animais aquáticos In: Veronesi R, Focaccia R (eds). São Paulo: Editora Atheneu. 1996.

- OLIVEIRA, F. N.; MORTARI, M. R.; CARNEIRO, F. P.; GUERRERO-VARGAS, J. A.; SANTOS, D. M.; PIMENTA, A.; SCHWARTZ, E. F. Another record of significant regional variation in toxicity of *Tityus serrulatus* venom in Brazil: A step towards understanding the possible role of sodium channel modulators. *Toxicon*, p. 33- 46. 2013.
- PAREJA-SANTOS, A.; SARAIVA, T. C.. COSTA, E. P.; SANTOS, M. F.; ZORN, T. T.;SOUZA, V. M. O.; LIMA, C. Delayed local inflammatory response induced by *Thalassophryne nattereri* venom is related to extracellular matrix degradation. *International journal of experimental pathology*, p. 34-43. 2009.
- POH, C.H.; YUEN, R.; KHOO, H.E.; CHUNG, M.C.D.; GWEE, M.C.E.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Purification and partial characterization of Stonustoxin (lethal factor) from *Synansea horrida* venom. *Comp. Biochem. Physiol* p. 793-798. 1992.
- PLATER, G.; MARTIN, R. L.; MILBURN, P. J. *Toxicon* 33, p. 157-159. 1995.
- PREISER, J.C.; SCHMARTZ, D.; VAN DER LINDEN, P.; CONTENT, J.; BUSSCHE, P.V.; BUURMAN, W.; SEBALD, W.; DUPONT, E.; PINSKY, M.R.; VINCENT, J.L. Interleukin-6 administration has no acute hemodynamic or hematologic effects in the dog. *Cytokines*, p. 1–4. 1991.
- RADU, M.; CHERNOFF, J. An in vivo Assay to Test Blood Vessel Permeability. *Journal of visualized experiments*. 2012.
- RAMOS, A. D.; CONCEICAO, K.; SILVA, JR. P. I.; RICHARDSON, M.;LIMA, C.;LOPES-FERREIRA, M. Specialization Of the Sting venom and skin mucus of *Cathorops spixii* reveals functional diversification of the toxins. *Toxicon*, p. 651-65. 2012.
- RESENDE, E.K. Recursos pesqueiros: diagnóstico e propostas de pesquisa. Corumbá: Embrapa-CPAP, p. 51. 1988.
- RIBEIRO, F. R. V. ; LUCENA, C. A. S. ; LUCINDA, P. H. F. Three new *Pimelodus* species (Siluriformes: Pimelodidae) from the rio Tocantins drainage, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, p. 455-464. 2008.
- RIBOLLI, J.; MELO , C.M.R.D.; ZANIBONI-FILHO, E. Genetic characterization of the neotropical catfish *Pimelodus maculatus* (Pimelodidae, Siluriformes) in the Upper Uruguay River. *Genetics and molecular biology*, p. 761-769. 2012.
- RIFKIN, J.; WILLIAMSON, J. Venomous fish. In: *Venomous and Poisonous Marine Animals. Medical and Biological Hand- book*, p. 354–395. 1996.
- RITTNER, H.L.; BRACK, A.; STEIN, C. Pain and the immune system. *Journal of Anaesthesia*, p. 40-44. 2008a.
- RUSSELL, F.E. *Venom poisoning. Rational Drug Therapy*, p. 1–7. 1971. RUSSELL, F.E. *Toxic effects of animals toxins in Casarett and Doull's Toxicology—The Basic Science of Poisons*, Sydney, 1996
- SABINO, J E PRADO, P.I. Síntese do Conhecimento da Diversidade Biológica de Vertebrados do Brasil. In LEVINSOHN, T. (Org.). *Avaliação do Estado do Conhecimento da Diversidade Brasileira*. Brasília-DF: Ministério do Meio Ambiente, vol. II, p. 55-143. 2006.
- SABINSON, L.; RODRIGUES- FILHO, J.; PERET, A.; VERANI, J. Growth and reproduction aspects of *Pimelodus maculatus* Lacépeède, 1803 (Siluriformes, Pimelodidae) of the Cachoeira Dourada reservoir, state of Goiás and Minas Gerais, Brazil. *Braz j Biol*, p. 450- 459. 2014

- SAUNDERS, P.R.; ROTHMAN, S.; MEDRANO, V.A.; CHIN, P. Cardiovascular actions of venom of the stonefish *Synanceia horrida*. *Am. J. Physiol*, p. 429-432. 1962.
- SAUVIAT, M.P.; MEUNIER, F.A.; DREGER, A.; MOLGO, J. Effects of trachynilysin, a protein isolated from stonefish (*Synanceia trachynis*) venom, on frog atrial heart muscle. *Toxicon*, p. 945-959. 2000.
- SCHAEFFER, R. C.; CARLSON, R. W.; RUSSELL, F. E. Some chemical properties of the venom of the scorpionfish *Scorpaena guttata*. *Toxicon*, p. 69-78. 1971.
- SCHMIDT, K. L.; SIMON, E. Thermoherapy of pain, trauma, and inflammatory and degenerative rheumatic diseases. In *Thermoherapy for Neoplasia, Inflammation, and Pain*, P. 527-539. 2001.
- SCHWARTZ, E. F.; SCHWARTZ, C. A.; SEBBEN, A.; LARGURA, S. W.; MENDES, E. G. Indirect cardiotoxic activity of the caecilian *Siphonops paulensis* (Gymnophiona, Amphibia) skin secretion. *Toxicon*, p. 47-54. 1999.
- SHEPHERD, S.; THOMAS, S. H.; KEITH STONE, C. Catfish envenomation. *Journal of Wilderness Medicine*, p.67-70. 1994.
- SHIOMI, K.; TAKAMIYA, M.; YAMANAKA, H.; KIKUCHI, T.; SUZUKI, Y. Toxins in the skin secretion of the oriental catfish (*Plotosus lineatus*): immunological properties and immunocytochemical identification of producing cells. *Toxicon*, p. 353-361. 1988.
- SILVA, G. C. D.; SABINO, J.; ALHO, C. J. R.; NUNES, V. L. B.; HADDAD, JR. V. Injuries and envenoming by aquatic animals in fishermen of Coxim and Corumbá municipalities, state of Mato Grosso do Sul, Brazil: identification of the causative agents, clinical aspects and first aid measures. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, p. 486-490. 2010.
- SIVAN, G. Fish venom: Pharmacological features and biological significance . *Fish and fisheries*, p. 159-172. 2009.
- SIVAN, G.; VENKETESVARAN, K.; RADHAKRISHNAM, C.K. Biological and biochemical properties of *Scatophagus argus* venom. *Toxicon*, p. 563-571. 2007.
- SMITH, W.L.; WHELEER, W.C. Venom evolution widespread in fishes: A road map for the bioprospecting of piscine venoms. *Journal of Heredity*, p. 206-217, 2006.
- SOSA-ROSALES, J.I.; PIRAN-SOARES, A.A.; FARSKY, S.H.; TAKEHARA, H.A.; LIMA, C.; LOPES-FERREIRA, M. Important biological activities induced by *Thalassophryne maculosa* fish venom. *Toxicon*, p. 155-161. 2005.
- SUTHERLAND, S.K.; TIBBALLS, J. *Australian Animals Toxins: The Creatures, their Toxins and Care of the Poisoned Patient*. 2^a ed, Oxford University Press, Melbourne, p. 473-475. 2001.
- TAN, N.H.; PONNUDURAI, G. Comparative study of the enzymatic, hemorrhagic, procoagulant and anticoagulant activities of some animal venoms. *Comp. Biochem. Physiol*, p. 299-302. 1992.
- TAN, N.H.; TAN, C.S. A comparative study of cobra (*Naja*) venom enzymes. *Comparative Biochemistry and Physiology*, p. 745-750. 1988.
- THULESIUS, O.; AI-HASSAN, J.M.; CRIDDLE, R.S.; THOMSON, M. Vascular responses elicited by venom of the Arabian catfish (*Arius thalassinus*). *Gen. Pharmacol*, p. 129-132. 1983.

- TIETZ, N.W. Specimen Collection and Processing; Sources of Biological Variation. Textbook of Clinical Chemistry, 2nd Edition, W.B. Saunders Co. Philadelphia, p. 798. 1994.
- TRESTRAIL, J.H.; AL-MAHASNEH, Q.M. Lionfish sting experiences of an inland poison center: a retrospective study of 23 cases. *Veterinary and Human Toxicology*, p. 173–175. 1989.
- VEIGA, S.S.; DA SILVEIRA, R.B.; DREYFUSS, J.L.; HAOACH, J.; PEREIRA, A.M.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W. Identification of high molecular weight serine proteases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. *Toxicon*, p. 825– 839. 2000.
- VENKAI AH, Y.; LAKSHMIPATHI, V. Biochemical composition of epidermal secretions and poisonous spine of two freshwater catfishes. *Asian Fish Sci*, p. 183–189. 2000.
- WILLIAMSON, J.A. Clinical toxicology of venomous Scorpaenidae and other selected fish stings. *Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons*, p. 142–158. 1995.
- WOOLF, C.J. Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. *Annals of Internal Medicine*, p. 441-451. 2004.
- WRIGHT, J. Diversity, phylogenetic distribution, and origins of venomous catfishes. *BMC evolutionary biology*, p. 282. 2009.
- WU, A. H. B. Creatine kinase isoforms in ischemic heart disease. *Clin. Chem*, p. 7-13. 1989.

<<http://www.terra.com.br/virtualbooks/freebook/port/Lport2/navionegreiro.htm>>.
Acesso em: 10 jan. 2002, 16:30:30.


10. ANEXO


Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 04 de fevereiro de 2015.


DECLARAÇÃO (2ª VIA)

Declaramos que o projeto intitulado "**CARACTERIZAÇÃO DOS PRINCIPAIS MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS ENVOLVIDOS COM A SINTOMATOLOGIA DOS ACIDENTES GERADOS PELO PEIXE PIMELODUS MACULATUS (LACEPÈDE, 1803) E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DO EXTRATO PROTEICO DE SUA PEÇONHA.**", UnBDoC n.º 63468/2014, sob responsabilidade da Professora Elizabeth Ferroni Schwartz foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília.



Prof. Dr. Rafael Plakoudi Souto Maior
Coordenador da CEUA

*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.